

# **Humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen entsprechen murinen B-1a-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Martina Przekopowitz  
aus Leverkusen

Oktober 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Wiebke Hansen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2017



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	12
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>13</b>
1.1. Das menschliche Immunsystem.....	13
1.2. Frühe B-Zellentwicklung .....	16
1.3. T-Zell-unabhängige Immunantworten .....	19
1.4. Keimzentrumsreaktion.....	19
1.5. Das CD5-Molekül und CD5 <sup>+</sup> B-Zellen .....	21
1.6. Murine B-1a-Zellen .....	23
1.7. Ziele der Arbeit .....	26
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1. Gewinnung von Probenmaterial .....	28
2.2. Isolierung von B-Zell-Populationen aus humanem Gewebe .....	28
2.3. Durchflusszytometrische Analysen und Zellsortierung.....	29
2.4. Zellzahlbestimmung .....	30
2.5. Isolierung von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen .....	30
2.6. Humanisierung von NSG-Mäusen mit HSC/Vorläuferzellen .....	30
2.7. Bestimmung der Stabilität der Ausprägung von CD5 auf B-Zellen .....	32
2.8. Bestimmung der Ausprägung von Aktivierungsmarkern .....	32
2.9. Korrelation des Anteils an PB CD5 <sup>+</sup> B-Zellen mit dem Spenderalter .....	32
2.10. Zellsortierung von B-Zell-Populationen aus Nabelschnurblut .....	33
2.11. Durchflusszytometrische Analyse von humanen peritonealen B-Zell-Populationen .....	33
2.12. Aufreinigung genomischer DNA .....	33
2.13. Auswertung von Transkriptionsprofilen .....	34
2.14. Analyse von IGHV-Gen-Umlagerungen humaner B-Zell-Populationen .....	34
2.14.1. V <sub>H</sub> -PCR, Klonierung und Sanger-Sequenzierung.....	35
2.14.2. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	42
2.14.3. Quantitative IGHV-Tiefensequenzierung .....	42
2.15. Analyse von IgM-Sekretion und intrazellulärem IgM .....	48
2.15.1. ELISpot-Assay .....	48

2.15.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie .....	49
2.16. Bestimmung von Proliferation in B-Zell-Populationen .....	49
2.17. Analyse der Überlebensfähigkeit von B-Zellen <i>in vitro</i> .....	50
2.18. pBLNK-Messung .....	51
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1. Phänotypische Charakterisierung von humanen, reifen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen aus PB.....	52
3.2. Die reife CD5 <sup>+</sup> B-Zell-Population enthält keine aktivierten B-Zellen.....	55
3.3. CD5 ist auf reifen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen ein stabiler Oberflächenmarker .....	56
3.4. Differentiell exprimierte Oberflächenmoleküle zwischen naiven und reifen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen .....	58
3.5. <i>In vitro</i> Studien zur T-Zell-abhängigen und –unabhängigen Stimulierbarkeit von reifen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen.....	60
3.5.1. Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen zeigen <i>in vitro</i> ein erhöhtes Überleben unter TI-1 Stimulierungsbedingungen.....	60
3.5.2. Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen zeigen <i>in vitro</i> ein verbessertes Proliferationsvermögen unter TI-Stimulierungsbedingungen .....	62
3.5.3. Präaktivierte CD5 <sup>+</sup> B-Zellen weisen weniger pBLNK nach anti-IgM-Antikörper-Stimulierung auf .....	64
3.6. CD5 <sup>+</sup> B-Zellen sezernieren IgM unter minimalen Stimulierungsbedingungen ..	66
3.7. Peritoneale Lokalisation .....	68
3.7.1. IGHV-Gen-Nutzung und Klonalitätsanalyse von reifen CD5 <sup>+</sup> und naiven B-Zellen der menschlichen Bauchhöhle.....	70
3.8. Humanisierung von NSG-Mäusen mit humanen CD34 <sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen..	70
3.8.1. Ausschließlich HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut konnten eine reife CD5 <sup>+</sup> B-Zell-Population im Peritoneum der Maus generieren.....	74
3.9. BCR-Repertoire humanisierter NSG-Mäuse .....	79
3.10. Der relative Anteil humaner PB CD5 <sup>+</sup> B-Zellen sinkt mit dem Alter .....	80
3.11. BCR-Repertoire reifer humaner CD5 <sup>+</sup> B-Zellen aus PB .....	83
3.11.1. Etablierung der IGHV-Repertoire-Tiefensequenzierung .....	83
3.11.2. Erste IGHV-Tiefensequenzierung reifer CD5 <sup>+</sup> und naiver B-Zellen.....	84

3.11.3. IGHV-Tiefensequenzierung Antigen-unerfahrener reifer CD5 <sup>+</sup> und konventioneller naiver B-Zellen .....	85
3.11.4. IGHV-Mutationsanalyse Antigen-unerfahrener PB B-Zellen.....	86
3.11.5. IGHV-Gen-Nutzung Antigen-unerfahrener PB B-Zellen .....	87
3.11.6. Klonalitätsanalyse von PB CD5 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> B-Zellen.....	88
3.11.7. IGHV-Mutations- und Klonalitätsanalyse Antigen-erfahrener CD5 <sup>+</sup> und CD5 <sup>-</sup> Gedächtnis-B-Zellen .....	89
3.12. BCR-Repertoire aus B-Zellen des Nabelschnurbluts .....	91
3.12.1. IGHV-Mutationsanalyse aus CD5 <sup>+</sup> und CD5 <sup>-</sup> B-Zellen aus Nabelschnurblut.....	92
3.12.2. IGHV-Gen-Nutzung von reifen CD5 <sup>+</sup> und naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut.....	92
3.12.3. Klonale Zusammensetzung reifer CD5 <sup>+</sup> und naiver B-Zellen aus Nabelschnurblut.....	94
3.12.4. CDRIII-Länge als Maß für den N-Nukleotid-Gehalt in IGHV-Gen-Umlagerungen .....	94
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>97</b>
4.1. Humane, reife PB CD5 <sup>+</sup> B-Zellen repräsentieren eine beständige, ruhende, homogene B-Zell-Population .....	97
4.2. Humane, reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen weisen Eigenschaften von murinen B-1a-Zellen auf.....	99
4.2.1. Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen sezernieren IgM.....	100
4.2.2. Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen reagieren präferenziell auf TI-simulierte Stimulation .....	101
4.2.3. Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen aus adultem PB nutzen ein ähnliches BCR-Repertoire wie naive B-Zellen.....	103
4.2.4. In der humanen Bauchhöhle befinden sich CD5 <sup>+</sup> B-Zellen .....	106
4.2.5. Die Anzahl der reifen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen nimmt mit dem Alter ab .....	107
4.2.6. CD5 <sup>+</sup> B-Zellen aus Nabelschnurblut weisen klonale Expansionen auf.....	107
4.2.7. HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut können reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen in NSG-Mäusen generieren .....	108

4.3. Zusammenfassender Vergleich von humanen, reifen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen und murinen B-1a-Zellen .....	111
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>115</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>123</b>
8.1. Publikationen .....	123
8.1.1. Originalpublikationen .....	123
8.1.2. Leserbrief.....	123
8.2. Danksagung .....	124
8.3. Tabellarischer Lebenslauf .....	126
8.4. Eidesstattliche Erklärungen .....	127
8.5. Anhang Tabellen .....	128

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AID	Engl.: <i>activation-induced cytidine deaminase</i>
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen (engl.: <i>antigen presenting cells</i> )
BCL6	Engl.: <i>b cell lymphoma 6</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl.: <i>B cell receptor</i> )
BM	Knochenmark (engl.: <i>bone marrow</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i> )
C	Konstante Region des B-Zell-Rezeptors
CCL25	Chemokin-Ligand 25
CCR2	C-C-Motif Chemokinrezeptor 2
CCR9	C-C-Motif Chemokinrezeptor 9
CD	Engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CDR	Hypervariable Region des B-Zell-Rezeptors (engl.: <i>complementarity determining region</i> )
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CLEC4C	Engl.: <i>C-type lectin domain family 4 member</i>
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CLP	Gemeinsame lymphoide Vorläufer (engl.: <i>common lymphoid progenitors</i> )
CMP	Gemeinsame myeloide Vorläufer (engl.: <i>common myeloid progenitors</i> )
CSR	Klassenwechsel (engl.: <i>class switch recombination</i> )
D	D-Segment der variable Region der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors (engl.: <i>diversity</i> )
DC	Dendritische Zellen
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Zweifach demineralisiertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EMP	Erythromyeloider Vorläufer (engl.: <i>erythromyeloid progenitor</i> )
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCRL4	Engl.: <i>FC receptor-like 4</i>
FDC	Follikuläre Dendritische Zellen (engl.: <i>follicular dendritic cells</i> )
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FR	Strukturgebende Region des B-Zell-Rezeptors (engl.: <i>frame work region</i> )
fT <sub>H</sub>	Follikuläre T-Helferzellen
GC	Keimzentrum (engl.: <i>germinal center</i> )
GCR	Keimzentrumsreaktionen (engl.: <i>germinal center reactions</i> )

gDNA	Genomische DNA
HCL	Hydrochlorid
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IA	Engl.: <i>index adapter</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL2R $\gamma$	Interleukin 2 Rezeptor $\gamma$
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
J <sub>H</sub>	J-Segment der variable Region der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors (engl.: <i>joining</i> )
LB	Luria broth
LMPP	Lymphoidgeprägter multipotenter Vorläufer (engl.: <i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i> )
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnet-assoziierte Zellsortierung (engl.: <i>magnetic activated cell sorting</i> )
MALT	Engl.: <i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>
MCP1	Engl.: <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i> )
mPB	Apherese (engl.: <i>mobilized from peripheral blood</i> )
MPP	Multipotenter Vorläufer (engl.: <i>multipotent progenitor</i> )
MZB	Marginalzonen-B-Zellen
NGS	Massive parallele Tiefensequenzierung (engl.: <i>next generation sequencing</i> )
NK	Natürliche Killer (Zellen)
NOD-SCID	Engl.: <i>non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency</i>
NSG	NOD.Cg- <i>Prkdc</i> <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wji</sup> /SzJ
PAMP	Pathogen-assoziierte Strukturen (engl.: <i>pathogen associated molecular patterns</i> )
PB	Peripheres Blut
pBLNK	Phosphorlierter <i>B cell linker</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Phosphorylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PeCy7	Phycoerythrin Cyanin 7
PerCP Cy5.5	Peridinin chlorophyll Cyanin 5.5
PI	Propidiumiodid
PRR	Struktur-Erkennungs-Rezeptoren (engl.: <i>pathogen recognition receptors</i> )
PtC	Phosphatidylcholin

PTPRJ	Engl.: Protein tyrosine phosphate receptor type J
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl.: <i>standard error of the mean</i> )
SHM	Somatische Hypermutation
SHP-1	Engl.: <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SYK	Engl.: <i>spleen tyrosine kinase</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: <i>T cell receptor</i> )
TD	T-Zell-abhängig (engl.: <i>T-dependent</i> )
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzellen Typ 1
T <sub>H</sub> 17	T-Helferzellen Typ 17
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzellen Typ 2
TI-1	T-Zell-unabhängig Typ 1 ( <i>T-independent type 1</i> )
TI-2	T-Zell-unabhängig Typ 2 ( <i>T-independent type 2</i> )
UA	Engl.: <i>universal adapter</i>
UCB	Nabelschnurblut (engl.: <i>umbilical cord blood</i> )
UMI	Engl.: <i>unique molecular identifier</i>
UV	Ultraviolett
V	Variable Region des B-Zell-Rezeptors
V <sub>H</sub>	V-Segment der variable Region der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors (engl.: <i>variability</i> )

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der somatischen Rekombination am Beispiel der schweren Kette des Antikörpers.....	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung des PCR-Produkts zur Tiefensequenzierung .....	44
Abbildung 3: Phänotypische Charakterisierung von humanen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen aus PB .....	54
Abbildung 4: CD5 <sup>+</sup> B-Zellen prägen mehr Oberflächen-IgM aus als naive B-Zellen.	55
Abbildung 5: Ausprägung von Aktivierungsmarkern auf reifen CD5 <sup>+</sup> und naiven B-Zellen. ....	56
Abbildung 6: Die CD5-Ausprägung auf reifen CD5 <sup>+</sup> B-Zellen ist stabil. ....	57
Abbildung 7: Differenziell ausgeprägte Gene zwischen naiven und CD5 <sup>+</sup> PB B-Zellen. ....	59
Abbildung 8: B-Zellüberleben unter TI- und TD-Stimulierungsbedingungen <i>in vitro</i> ..	61
Abbildung 9: Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen zeigen ein gesteigertes Überleben unter TI-1-ähnlicher Stimulierung. ....	62
Abbildung 10: Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen weisen eine gesteigerte Proliferation nach TI-2-Stimulierung auf.....	63
Abbildung 11: Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen zeigen unter TI-ähnlicher Stimulierung eine höhere Proliferationskapazität als naive B-Zellen.....	64
Abbildung 12: Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen erhöhen nach Stimulierung die Ausprägung von FcR4L. ....	65
Abbildung 13: Eine reduzierte Anzahl an reifen CD5 <sup>+</sup> PB B-Zellen zeigen pBLNK nach einer Stunde anti-IgM-Antikörper-Stimulierung, wenn sie TI-ähnlich prästimuliert wurden. ....	66
Abbildung 14: Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen sezernieren schnell und effizient IgM. ....	68
Abbildung 15: In humanen Bauchhöhlen befinden sich CD5 <sup>+</sup> B-Zellen.....	69
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Kapazität von humanen HSC/Vorläuferzellen B-Lymphozyten-Populationen zu generieren.....	71
Abbildung 17: Beispiel zur Bestimmung der Transplantationseffizienz humaner Zellen in NSG-Mäusen nach Transfer von humanen HSC/Vorläuferzellen. ...	72



Abbildung 18: HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut erreichen eine wesentlich höhere Transplantationseffizienz als solche aus PB oder KM adulter Spender. ....	73
Abbildung 19: <i>Gating</i> -Strategie zur Bestimmung von B-Zell-Populationen in rekonstituierten NSG-Mäusen. ....	74
Abbildung 20: Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen im Peritoneum der Maus werden ausschließlich durch HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut generiert. ....	75
Abbildung 21: Analyse rekonstituierter B-Zell-Populationen in verschiedenen Geweben humanisierter Mäuse.....	77
Abbildung 22: Analyse reifer B-Zellen in humanisierten Mäusen .....	78
Abbildung 23: Beispiele und <i>Gating</i> -Strategie zur Ermittlung des Anteils reifer CD5 <sup>+</sup> B-Zellen in Abhängigkeit des Spenderalters.....	80
Abbildung 24: Der relative Anteil reifer CD5 <sup>+</sup> B-Zellen im PB gesunder Menschen sinkt mit dem Alter. ....	82
Abbildung 25: Mutationsfrequenzen der amplifizierten IGHV-Gen-Umlagerungen (Set#1).....	85
Abbildung 26: Mutationsfrequenzen der amplifizierten IGHV-Gen-Umlagerungen (Set#2).....	86
Abbildung 27: IGHV-Nutzung reifer CD5 <sup>+</sup> B-Zellen aus PB im Vergleich zu naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen. ....	88
Abbildung 28: IGHV-Mutationsfrequenzen von CD5 <sup>+</sup> und CD5 <sup>-</sup> frühen Gedächtnis-B-Zellen (Set#3). ....	90
Abbildung 29: IGHV-Mutationsfrequenzen aus reifen CD5 <sup>+</sup> und naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut.....	92
Abbildung 30: IGHV-Gen-Nutzung von reifer CD5 <sup>-</sup> und naiver B-Zellen aus Nabelschnurblut.....	93
Abbildung 31: CDRIII-Längenverteilung der IGHV-Gene der CD5 <sup>+</sup> und CD5 <sup>-</sup> B-Zellen aus Nabelschnurblut. ....	95

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Effizienz der Transplantationen von humanen HSC/Vorläuferzellen in NSG-Mäusen. ....	73
Tabelle 2: Klonale Zusammensetzung humaner, reifer CD5 <sup>+</sup> B-Zellen, naiver B-Zellen und IgD <sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen aus PB. ....	89
Tabelle 3: Klonale Zusammensetzung humaner CD5 <sup>+</sup> CD23 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> und CD5 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> B-Zellen aus PB. ....	91
Tabelle 4: Klonale Zusammensetzung humaner, reifer CD5 <sup>+</sup> B-Zellen und naiver B-Zellen aus Nabelschnurblut. ....	94

# 1. Einleitung

## 1.1. Das menschliche Immunsystem

Der menschliche Organismus ist kontinuierlich Fremdstoffen wie z.B. Pathogenen (Bakterien, Viren, Pilze) ausgesetzt, die eine Bedrohung darstellen können. Zum Schutz vor diesen Fremdstoffen stehen dem Organismus verschiedene Abwehrmechanismen zur Verfügung. Zuerst wirken die körpereigenen Epithelien als mechanische Barriere. Werden diese überwunden, z.B. bei einer Infektion mit Pathogenen, greifen weitere Mechanismen des Immunsystems, um Erkrankungen vorzubeugen.

Ein wesentlicher Bestandteil des Immunsystems sind spezialisierte Zellen, die sogenannten Leukozyten, welche zum hämatopoetischen System gehören. Hämatopoetische Stammzellen (engl.: *hematopoietic stem cells*, HSC) generieren zum einen myeloide Vorläuferzellen (engl.: *common myeloid progenitors*, CMP), die den Ursprung von Monozyten, Granulozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen (DC), Erythrozyten und Megakaryozyten darstellen. Zum anderen werden lymphoide Vorläuferzellen (engl.: *common lymphoid progenitor*, CLP) gebildet, aus denen sich B- und T-Lymphozyten sowie Natürliche Killer (NK)-Zellen entwickeln (Murphy, 2008).

Das Immunsystem lässt sich in zwei Bereiche gliedern, die angeborene und die adaptive Immunität. Beide Systeme haben gemeinsam, dass sie körperfremde Strukturen erkennen und beseitigen können. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Spezifität und Geschwindigkeit der Immunantworten und auch durch die beteiligten Zelltypen.

Die angeborene Immunität greift zeitnah bei einer Infektion und ist in der Lage den größten Anteil körperfremder Stoffe zu beseitigen, bevor die adaptive Immunantwort einsetzt. Zentraler Mechanismus der angeborenen Immunität ist die Erkennung von Fremdstoffen durch sogenannte Struktur-Erkennungs-Rezeptoren (engl.: *pathogen recognition receptors*, PRR), die eine breite Auswahl an charakteristischen Pathogen-assoziierten Strukturen (engl.: *pathogen associated molecular patterns*, PAMP), wie bakterielle Zellwandbestandteile, bakterielle oder virale Desoxyribonukleinsäure (engl.: *deoxyribonucleic acid*, DNA) und virale Ribonukleinsäure (engl.: *ribonucleic acid*, RNA) erkennen. Da diese PAMPs nicht für individuelle Pathogene spezifisch sind, spricht man hier von einer unspezifischen Immunantwort (Murphy, 2008).

Ein wichtiger humoraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem. Es besteht aus etwa dreißig Proteinen, die in der Leber gebildet werden und mit dem Blutserum zirkulieren. Komplexe dieser Proteine können unter anderem PAMPs auf der Oberfläche von Pathogenen opsonisieren und diese damit für Immunzellen zur Phagozytose markieren. Außerdem können sie Poren in der Zellmembran von Pathogenen generieren, die deren Lyse zur Folge haben. Eine dritte Funktion ist die Generierung von Lockstoff-Gradienten, die zur Rekrutierung von Immunzellen führen können. Zur angeborenen Immunität gehören ebenfalls körpereigene, antibiotisch / antiviral wirkende Moleküle (Ganz et al., 1985; Murphy, 2008).

Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen vor allem Leukozyten der myeloiden Linie. Granulozyten phagozytieren Pathogene, können nach Aktivierung degranulieren und immunologisch aktive Moleküle freisetzen, die zytotoxisch wirken und umliegendes Gewebe modellieren. Mastzellen befinden sich unter anderem in Schleimhäuten in der Nähe von Gefäßen, erkennen Immunglobulin (Ig)E-Antikörper-gebundene Antigene (v.a. Parasiten und nasopharyngeale Pathogene) und degranulieren. Sie setzen Histamin und Heparin frei und vermitteln eine Immunreaktion, die durch die Erweiterung der Blutgefäße und Ansammlung von Flüssigkeit im Gewebe charakterisiert ist. NK-Zellen entstammen der lymphoiden Linie. Sie sind in der Lage bestimmte, durch Viren infizierte Zellen und entartete Körperzellen anhand fehlender Haupthistokompatibilitätskomplex Typ I (MHC-I)-Ausprägung zu identifizieren und in diesen Zellen Zelltod durch Apoptose auszulösen. Makrophagen entstehen aus aktivierten Monozyten im Gewebe. Makrophagen und DCs eliminieren Pathogene durch Phagozytose und sezernieren Zytokine und Chemokine, die wiederum immunmodulatorisch auf weitere Immunzellen wirken. Vor allem sind sie professionelle Antigen-präsentierende Zellen (engl.: *antigen presenting cells*, APCs), die eingedrungene Pathogene mittels ihrer PRRs erkennen, phagozytieren, verdauen und einzelne Fremd-Peptide über Haupthistokompatibilitätskomplexe des Typs II (engl.: *major histocompatibility complex type II*, MHC-II) auf ihrer Oberfläche präsentieren. Damit verbinden APCs das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem (Murphy, 2008).

Adaptive Immunantworten werden durch B- und T-Lymphozyten vermittelt. Beide Zelltypen zeichnen sich durch Antigen-erkennende Rezeptoren aus, die über eine Umlagerung von Gensegmenten (somatische Rekombination) gebildet werden. Der Aufbau dieser Antigen-erkennenden Rezeptoren ist individuell verschieden für jede

neu gebildete B-Zelle und vermittelt Unterschiede in der Spezifität bzw. Affinität für individuelle Antigene. Diese Spezifität ist die erste Grundlage für die adaptive Immunantwort.

Durch APCs präsentierte Antigene (ausschließlich Peptid-Antigene) können von T-Lymphozyten mittels ihres T-Zell-Rezeptors (engl.: *T cell receptor*, TCR) spezifisch erkannt werden. Der B-Zell-Rezeptor (engl.: *B cell receptor*, BCR) hingegen erkennt nicht-MHC-gebundene und auch nicht-Peptid-Antigene. Das Binden der Antigene an TCR bzw. BCR initiiert eine Änderung in der Struktur dieser Rezeptoren und führt zu einem intrazellulären Signal. Dieses Signal versetzt die Lymphozyten in einen aktiven Zustand. Die aktivierten Lymphozyten expandieren klonal und verrichten ihre immunologischen Effektorfunktionen. Die Expansion stellt eine positive Selektion ausgewählter (kognitiver) Lymphozyten dar und verstärkt die spezifische Immunantwort, ein weiteres Charakteristikum der adaptiven Immunität. Ein Teil der aktivierten Zellen verbleibt nach Abklingen der Immunantwort als selektierte, leicht reaktivierbare, Antigen-erfahrene Gedächtnis-Lymphozyten. Diese werden bei erneutem Kontakt mit spezifischem (oder strukturell gleichem) Antigen reaktiviert und vermitteln eine beschleunigte und effizientere Immunantwort. T-Zellen differenzieren bei Aktivierung zu Effektorzellen aus. T-Helferzellen Typ 1 ( $T_H1$ ) unterstützen die Aktivierung von Makrophagen, T-Helferzellen Typ 2 ( $T_H2$ ) unterstützen B-Zellen und T-Helferzellen Typ 17 ( $T_H17$ ) unterstützen vor allem neutrophile Granulozyten. Zytotoxische T-Zellen erkennen durch Viren infizierte Zellen, die intrazelluläre, virale Antigene über MHC-I präsentieren, und lösen Apoptose in befallenen Zellen aus. B-Zellen können nach Aktivierung zu Plasmablasten, bzw. Plasmazellen ausdifferenzieren, die große Mengen Antigen-spezifischer Antikörper sezernieren. B-Zellen haben außerdem die Besonderheit, dass sie bei Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen und entsprechender Kostimulation von follikulären T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) und APCs in sogenannten Keimzentrumsreaktionen (GCR, engl.: *germinal center reactions*) die Affinität zu diesem Antigen systematisch erhöhen können. Diese Aspekte werden in den folgenden Abschnitten ausführlicher beschrieben (Murphy, 2008).

Während die angeborene Immunität schnell und relativ unspezifisch auf körperfremde Stoffe reagiert, benötigt die adaptive Immunität Zeit, um sich an die Besonderheiten der Erreger anzupassen, eine spezifische und effizientere Immunantwort zu gewährleisten und darüber hinaus ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Das fein regulierte Zusammenspiel der angeborenen und

adaptiven Immunität ermöglicht auf verschiedenen Ebenen den Schutz des Organismus vor einer theoretisch unbegrenzten Anzahl von Fremdstoffen.

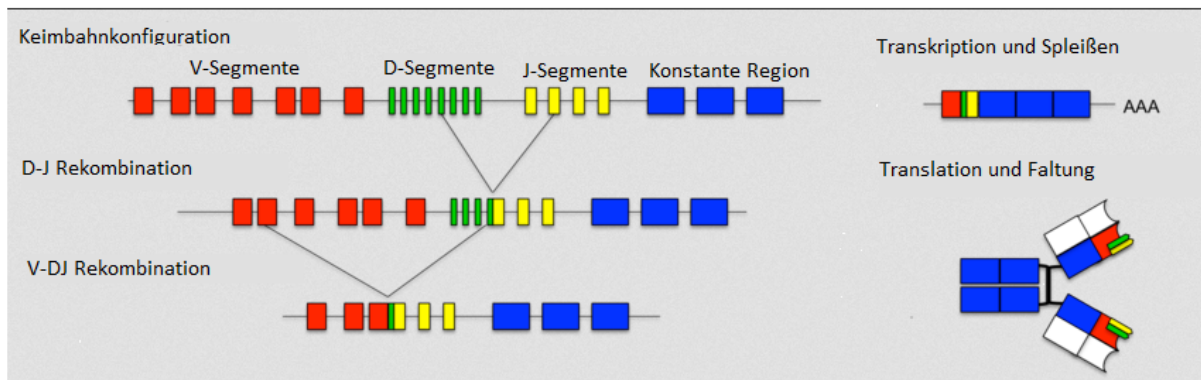
## 1.2. Frühe B-Zellentwicklung

B-Zellen werden in der fötalen Leber sowie im adulten Knochenmark gebildet. Essentiell für jede neu generierte B-Zelle ist die Ausbildung eines einzigartigen BCR, welcher die spezifische Erkennung von Antigenen vermittelt.

Der BCR und seine lösliche Form, der Antikörper, werden durch Immunglobulin-(Ig-)Gene kodiert. Der Antikörper ist ein Homodimer aus je zwei leichten und zwei schweren Ketten, welche kovalent miteinander verbunden sind. Aminoterminal befindet sich die variable, Antigen-erkennende Region (engl.: *variable region*, V) und carboxyterminal die konstante Region (engl.: *constant region*, C). Die C-Region der schweren Kette vermittelt den Isotyp und somit die Effektorfunktionen des Antikörpers. Die C-Region kann durch C $\mu$  (IgM)-, C $\delta$  (IgD)-, eines von vier C $\gamma$  (IgG)-, eines von zwei C $\alpha$  (IgA)- oder die C $\epsilon$  (IgE)-Regionen kodiert werden. Die V-Regionen beider Ketten werden durch Gensegmente kodiert, die durch somatische Rekombination miteinander verbunden werden. Die V-Region lässt sich in konservierte, strukturgebende Abschnitte (engl.: *frame work regions*, FR) und hypervariable Regionen (engl.: *complementarity determining regions*, CDR), welche die Bindungseigenschaften des Rezeptors bestimmen, einteilen. Die V-Region der schweren Kette setzt sich aus je einem V<sub>H</sub>- (engl.: *variability*), D<sub>H</sub>- (engl.: *diversity*) und J<sub>H</sub>- (engl.: *joining*) Segment zusammen. Hierfür stehen ca. 40 verschiedene V<sub>H</sub>-, 27 D<sub>H</sub>- und 6 J<sub>H</sub>-Segmente zur Verfügung (Corbett et al., 1997). Die V-Region der leichten Kette besteht aus einem V- und einem J-Segment, wobei diese durch Ig $\kappa$  oder Ig $\lambda$  kodiert sein können. Es stehen 40 V $\kappa$ - und 5 J $\kappa$ - bzw. 30 V $\lambda$ - und 4 J $\lambda$ -Segmente zur Verfügung (Murphy, 2008).

Die Umlagerung der Gensegmente beginnt in Pro-B-Zellen, mit der variablen Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>) auf Chromosom 14. Zunächst wird ein D<sub>H</sub>- mit einem J<sub>H</sub>-Segment verbunden. Anschließend wird eines der V<sub>H</sub>-Segmente angefügt. Während der Rekombination der Gensegmente entstehen DNA-Doppelstrangbrüche, welche durch DNA-Reparaturmechanismen unter Verlust der dazwischenliegenden Sequenz verknüpft werden (Abb. 1). Ein Zwischenstadium ist die Generierung von Haarnadelstrukturen an den freien Enden der Strangbrüche. Das Auftrennen dieser Haarnadelstrukturen führt zu kurzen palindromischen Sequenzen, sogenannte P-

Nukleotide. Außerdem werden durch die Exonukleaseaktivität der Terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) einzelne Nukleotide in variabler Anzahl entfernt oder ergänzt (nicht-genomisch kodierte Nukleotide bzw. N-Nukleotide). Diese Mechanismen sorgen für weitere Variabilität, bergen allerdings die Gefahr, das Leseraster zu verschieben oder Stopcodons einzufügen und damit die Funktionstüchtigkeit des BCR zu beeinträchtigen. Ein bestimmter Abschnitt der umgelagerten Gene, welcher einen Teil des  $V_H$ -Segments, das vollständige  $D_H$ - sowie einen Teil des  $J_H$ -Segments beinhaltet, wird als CDRIII bezeichnet und besitzt aufgrund der Vielfalt der Segmentkombinationen und Rekombinationsstellen den größten Einfluss auf die Antikörper-Variabilität. Die konstante Region schließt sich carboxyterminal an die  $V_H D_H J_H$ -Gen-Umlagerung an und entspricht zu diesem Zeitpunkt dem Isotyp IgM. Diese schwere Kette wird in Kombination mit einem Leichtkettensurrogat ( $V_{preB}$  und  $\lambda 5$ ) auf der Oberfläche der B-Zelle auf ihre Funktionalität hin getestet. Wird durch die Überprüfung ein nicht-funktionstüchtiger BCR festgestellt, d.h. ein instabiler Aufbau oder eine Falschfaltung des Proteins liegt vor oder das Leichtkettensurrogat kann nicht angelagert werden, kann die somatische Rekombination des zweiten Allels erfolgen. Ist dieser zweite Versuch erfolgreich, erfolgt die Umlagerung der leichten Kette des Igk-Lokus auf Chromosom 2. Leichte Ketten besitzen kein D-Segment. Somit erfolgt eine Rekombination von  $V_k$  zu  $J_k$ . Ist das Produkt der Kette nicht funktionstüchtig, so wird eine Rekombination sukzessive auf dem zweiten Allel und dann den Allelen des Ig $\lambda$ -Lokus auf Chromosomen 22 durchgeführt. Entsteht final ein funktionstüchtiger BCR, wird dieser auf der Oberfläche von unreifen B-Zellen als IgM<sup>high</sup> ausgeprägt. Die Membranständigkeit wird durch ein Element der konstanten Region gewährleistet, welches durch Spleißen der mRNA entfernt werden kann und die Sekretion von löslichen BCR, sogenannten Antikörpern, ermöglicht. Ist der BCR nicht funktionstüchtig, wird Apoptose eingeleitet und die B-Zelle eliminiert (Murphy, 2008).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der somatischen Rekombination am Beispiel der schweren Kette des Antikörpers.**

(adaptiert aus Murphy et al., 2000)

Die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten der Gensegmente, das Einfügen von N- und P-Nukleotiden sowie die Kombinationsmöglichkeiten von schweren und leichten Ketten ermöglicht eine enorme Diversität an einzigartigen BCR. Deren Spezifitäten richten sich theoretisch gegen eine ebenso große Vielfalt an Epitopen, natürlich auch gegen körpereigene Strukturen. Um Autoreaktivität zu vermeiden wird die Spezifität des BCR jeder B-Zelle auf Reaktivität gegen Autoantigene getestet, bevor diese in die Peripherie entlassen wird. Stromazellen im Knochenmark haben die besondere Eigenschaft mehrere tausend verschiedene gewebespezifische Autoantigene ausprägen und mittels MHC-I auf ihrer Oberfläche präsentieren zu können. Zeigt der BCR einer neu generierten B-Zelle eine zu hohe Affinität für eines dieser körpereigenen Strukturen, können verbliebene, nicht-rearrangierte V-Gensegmente der leichten Kette zur erneuten Rekombination (engl.: *V-gene editing*) genutzt werden. Verhilft dieser Mechanismus nicht zu einem funktionstüchtigen, nicht selbstreaktiven BCR, so werden diese B-Zellen durch Apoptose eliminiert oder durch Anergie stillgelegt. Erfolgreich selektierte, reife B-Zellen gelangen ins periphere Blut (engl.: *peripheral blood*, PB), wo sie mit ihren einzigartigen Spezifitäten das breite BCR-Repertoire stellen. Reife, Antigen-unerfahrene B-Zellen prägen  $\text{IgM}^{\text{low}}$  und  $\text{IgD}^{\text{high}}$  als Resultat alternativen Spleißens aus (Murphy, 2008).

Auf diese Weise wird sichergestellt, dass ausschließlich B-Zellen mit einem funktionstüchtigen BCR positiv-selektiert werden und autoreaktive B-Zellen gegenselektiert werden. Statistisch gesehen kann der BCR einer neu generierten B-Zelle aus genannten Gründen dem keiner anderen gleichen. Daher kann die



Einzigartigkeit des BCR als molekularer Marker einzelner bzw. klonal verwandter B-Zellen herangezogen werden.

### 1.3. T-Zell-unabhängige Immunantworten

Die Stimulierung des BCR alleine kann ausreichen, um eine Aktivierung der B-Zelle zu erreichen. Dies ist abhängig von der Art des Antigens, welches vom BCR gebunden wird. T-Zell-unabhängige Antigene des Typs 2 (engl.: *Thymus independent antigen type 2*, TI-2), in ausreichender Menge, besitzen die Fähigkeit durch ihre hoch repetitiven Strukturen BCRs polyvalent binden zu können, d.h. eine B-Zelle durch die gleichzeitige Aktivierung mehrerer BCR zu stimulieren. Zu TI-2 Antigenen gehören z.B. Oberflächenstrukturen von Bakterienkapseln.

Ein weiterer TI-Antigentyp kann anhand seiner Wirkungsweise unterschieden werden. TI-Antigene des Typs 1 (TI-1) werden über PRRs der B-Zellen, z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR), erkannt und führen zur direkten Stimulierung und polyklonalen Expansion. Beispiele für TI-1-Antigene, die auch als Mitogene bezeichnet werden, sind Bestandteile der bakteriellen DNA (z.B. CpG-Polymere) und bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) (Murphy, 2008).

TI-Antigene können B-Zellen zur Proliferation, Differenzierung sowie Antikörpersezerernierung treiben. TI-Immunantworten generieren in der Regel kurzlebige Plasmazellen, die kurzfristig große Mengen Antikörper produzieren können. Diese Antikörper sind oftmals in der Lage z.B. eine akute Infektion bereits in einer frühen Phase einzudämmen oder sogar aufzuhalten. Die Ausbildung von langlebigen Gedächtnis-B-Zellen und langlebigen Plasmazellen bleibt in TI-Immunantworten aus (Defrance et al., 2011).

### 1.4. Keimzentrumsreaktion

Neben der Aktivierung durch TI-Antigene, können B-Zellen in T-Zell-abhängigen (engl.: *Thymus dependent*, TD) Immunantworten aktiviert werden. Hierbei spielt die Bildung von immunologischen Synapsen durch APCs, T-Zellen und B-Zellen im Rahmen von GCR eine wesentliche Rolle. Keimzentren (engl.: *germinal centers*, GC) sind charakteristische, histologische, transiente Strukturen in B-Zell-Follikeln in sekundären lymphatischen Organen. Im Folgenden wird der Ablauf der GCR skizziert.

Ruhende naive (Antigen-unerfahrene) B-Zellen zirkulieren im PB, befinden sich jedoch auch in bestimmten Strukturen, den primären B-Zell-Follikeln in sekundären lymphatischen Organen. Dort befindet sich ebenfalls ein Netzwerk von follikulären dendritischen Zellen (engl.: *follicular dendritic cells*, FDC), die Antigene präsentieren können. Aktivierte B-Zellen migrieren zur B-Zell-T-Zell-Grenze (interfollikuläre Region), wo sie proliferieren und auf ebenfalls aktivierte, (Antigen-spezifische)  $T_H$ -Zellen treffen. Wenn aktivierte T-Zellen das von B-Zellen über MHCII präsentierte Antigen ebenfalls spezifisch erkennen, entsteht eine wechselseitige Kostimulation. Eine frühe Folge dieser wechselseitigen Stimulierung sind sogenannte primäre Fokusreaktionen. Im Rahmen dieser primären Fokusreaktion proliferiert ein Teil der aktivierten B-Zellen außerhalb des Follikels und differenziert zu kurzlebigen Plasmazellen, welche großen Mengen an unspezifischen Antikörpern, zumeist vom Isotyp IgM, sezernieren. Ein kleiner Teil der aktivierten B- und T-Zellen migriert ins Zentrum des Follikels und initiiert eine GC-Reaktion; in diesem Fall spricht man von einem sekundären Follikel. Unter T-Zell-Hilfe aktivierte B-Zellen prägen *BCL6* (engl.: *b cell lymphoma 6*), den hauptverantwortlichen Transkriptionsfaktor für den GC-B-Zell-Phänotyp, aus und proliferieren stark (Kitano et al., 2011). Dadurch werden ansässige B-Zellen in die sogenannte Mantelzone gedrängt, welche das Keimzentrum umgibt. Das reife Keimzentrum besteht aus zwei Zonen, die sich histologisch unterscheiden lassen. In der hellen Zone befindet sich ein Gemisch aus B-Zellen, den sogenannten Zentrozyten,  $T_{FH}$ , FDC und Makrophagen. Die dunkle Zone ist dicht mit B-Zellen, den sogenannten Zentroblasten, besiedelt. Zentrozyten werden in der hellen Zone auf ihre Affinität für präsentierte Antigene getestet. In dem Versuch die Affinität des BCR zu steigern, setzt in den proliferierenden Zentroblasten die somatische Hypermutation (SHM) ein. Dieser Mechanismus ist ausschließlich GC-B-Zellen vorbehalten und wird durch das Enzym AID (engl.: *activation-induced cytidine deaminase*) eingeleitet, welches zur Deaminierung einzelner Cytosine und damit zu einer fehlerhaften Basenpaarung in der IgV-Region führt. Durch verschiedene, oft fehlerhafte Reparaturmechanismen, kann es zum Nukleotidaustausch, also zu Punktmutationen oder seltener Deletionen/Amplifikationen, kommen. Ein Aminosäureaustausch innerhalb der V-Region kann zu Affinitätsänderungen des BCR führen (Murphy, 2008). Die Mutationsrate ist einzigartig hoch in normalen humanen Zellen und beträgt  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  pro Basenpaar pro Zellteilung (Kocks et al., 1989). SHM kann außerdem nicht-Ig-Gene wie z.B. *BCL6* betreffen, allerdings mit deutlich niedriger Frequenz

(Pasqualucci et al., 1998). Führen Mutationen in V-Genen zur Affinitätssteigerung, erhält die Zelle verstärkte Überlebenssignale. Ein Mangel an Affinitätssteigerung oder Affinitätsverlust (oder gar Verlust der Funktionalität des BCR) erntet schwächere Kostimulation und führt in der Konkurrenz mit höher affinen GC-B-Zellen zu Apoptose und Eliminierung der betroffenen B-Zellen. Zur Affinitätssteigerung sind repetitive Zyklen von Mutation, Selektion und Proliferation notwendig, hierfür pendeln GC-B-Zellen zwischen heller und dunkler Zone des Keimzentrums. Durch Klassenwechsel (engl.: *class switch recombination*, CSR) kann außerdem der Isotyp des BCR und somit die Effektorfunktion des späteren Antikörpers verändert werden. CSR wird durch sterile Transkripte der C-Region eingeleitet und die AID- und AP-Endonuklease 1 (Ape1)-Aktivität führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen. Beim CSR werden die konstanten Regionen (ursprünglich C $\mu$  und C $\delta$ ) durch eine andere C-Region ersetzt und somit mit einem der vier IgG-Isotypen, einem der zwei IgA-Isotypen oder mit dem IgE- konstanten Terminus ausgeprägt. Es ist ebenfalls möglich, dass eine B-Zelle entweder nur IgM oder nur IgD ausprägt. Schließlich differenzieren positiv-selektierte GC-B-Zellen zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen aus und verlassen das Knochenmark (De Silva et al., 2015).

V(D)J-Rekombination, SHM und CSR sind Mechanismen, die der genetischen Varianz des Antikörpers dienen. Allerdings bergen Eingriffe ins Genom der Zelle auch Gefahren, da sie zu genetischen Komplikationen wie z.B. Aktivierung von Onkogenen/Deaktivierung von Tumorsuppressoren führen können, die die Entstehung von Neoplasien, wie Lymphomen und Leukämien, verursachen können (Haluska et al., 1986; Küppers et al., 2001; Tsujimoto et al., 1985).

GC-Reaktionen erlauben die Generierung einer großen Zahl von affinitätsgereiften und -selektierten B- und T-Lymphozyten mit anschließender Generierung von Plasmazellen, welche mittels Sekretion hoch affiner Antikörper gezielt eine Infektion mit hoher Effizienz beseitigen können. Außerdem entsteht ein langfristiges immunologisches Gedächtnis, welches sich bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger schnell reaktivieren lässt.

## 1.5. Das CD5-Molekül und CD5<sup>+</sup> B-Zellen

Humanes CD5 (engl.: *cluster of differentiation 5*) ist ein Transmembran-Glykoprotein der Scavenger-Rezeptor-Cysteinreichen-Familie. Es hat eine Größe von 67 kDa und ist auf Chromosom 11 kodiert (Huang et al., 1987; Padilla et al., 2000). CD5 wird im

humanen System auf der Oberfläche von fast allen T-Zellen, aber auch auf einer kleinen Fraktion (15-20%) der PB B-Zellen ausgeprägt (Caligaris Cappio et al., 1981). CD5 dient der Herunterregulierung von Zellaktivierung durch BCR-/TCR-Stimulierung (Bikah et al., 1996). Hierzu rekrutiert CD5 intrazellulär die Tyrosinphosphatase SHP-1 (engl.: *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*), welche phosphoryliert und aktiviert wird. SHP-1 unterdrückt die intrazelluläre Weiterleitung von BCR-/TCR-Signalen durch seine Phosphataseaktivität für BCR- und TCR-Signal weiterleitende Kinasen (Sen et al., 1999). Es wird vermutet, dass CD5 damit die notwendige Intensität der BCR- bzw. TCR-Stimulierung durch Antigene zur Aktivierung des Lymphozyten heraufsetzen kann, was z.B. zur Vermeidung von Autoreaktivität beitragen könnte (Bikah et al., 1996; Hippen et al., 2000). Bis heute ist der Ligand für CD5 nicht eindeutig geklärt. Es wurden CD72, CD5 selbst und Teile der IGHV-FR vorgeschlagen (Pospisil et al., 1996; Van de Velde et al., 1991). Außerdem verweisen neuste Publikationen auf eine direkte Bindung von Interleukin (IL)-6 an CD5 (Zhang et al., 2016).

CD5 ist in verschiedenen Spezies stark konserviert, was auf eine wichtige Funktion hinweist (Huang et al., 1987). Während im Menschen nur ein Teil der B-Zellen CD5 ausprägt, wird CD5 von allen B-Zellen in Hühnern (Koskinen et al., 1998) und Hasen (Raman et al., 1992), auf einem kleineren Anteil der B-Zellen in Meerschweinchen (Appleyard et al., 1998), Rindern (Yang et al., 1995) und Schafen (Chevallier et al., 1998) und nicht auf B-Zellen in Ratten ausgeprägt (Vermeer et al., 1994). Interessanterweise lässt sich in Mausmodellen eine distinkte B-Zelllinie mit einzigartigen funktionellen Eigenschaften durch die CD5-Ausprägung abgrenzen (Kantor et al., 1993) (siehe Kapitel 1.6).

Im humanen System lassen sich in verschiedenen Geweben, z.B. im Knochenmark und PB, CD5<sup>+</sup> B-Zellen feststellen. Für normale B-Zellen ist bekannt, dass unreife, transitionelle B-Zellen CD5 ausprägen, allerdings an Ausprägung verlieren sobald sie das Knochenmark verlassen und zu konventionellen, reifen B-Zellen werden (Sims et al., 2005). Besonders hoch ist der Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen im fötalen, lymphoiden Gewebe wie der Leber (Lydyard et al., 1999) und im Nabelschnurblut von Neugeborenen, wobei der Anteil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen mit dem Alter des Fötus sinkt. Im PB gesunder Erwachsener beträgt der Anteil CD5<sup>+</sup> B-Zellen unter allen B-Zellen etwa 20% (Youinou et al., 1999). Neben unreifen B-Zellen prägt auch ein erheblicher Anteil reifer B-Zellen des PB CD5 aus. Die Funktion dieser reifen Zellen konnte bis heute nicht hinreichend geklärt werden. Verschiedene Studien haben

unterschiedliche Funktionen vorgeschlagen. Z.B. wurde beschrieben, dass CD5 von konventionellen (CD5<sup>-</sup>) B-Zellen nach Aktivierung ausgeprägt werden kann (Werner-Favre et al., 1989). Damit stellt sich die Frage, ob CD5 auf humanen B-Zellen als transientes Molekül, z.B. als Aktivierungsmarker, zu verstehen ist oder möglicherweise konsistent und konstant von bestimmten B-Zellen unabhängig ihres Aktivierungsstatus ausgeprägt wird und damit als Marker für eine distinkte Population unter reifen B-Zellen verwendet werden kann. Handelt es sich bei reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen um eine distinkte Population, so stellt sich die Frage nach deren immunologischen Funktionen.

Der Anteil CD5-ausprägender B-Zellen ist für einige Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis und Sjögrens Syndrom, als erhöht beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass CD5<sup>+</sup> B-Zellen in solchen Erkrankungen für die Produktion autoreaktiver Antikörper verantwortlich sind (Casali et al., 1987; Hardy et al., 1987). Zudem bilden neben normalen B-Zellen bestimmte lymphoide Neoplasien, wie die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL), das Mantelzelllymphom und seltener MALT-Lymphome (engl.: *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*), das Oberflächenmolekül aus. Ob die Ausprägung durch den Ursprung in normalen Zellen, also CD5<sup>+</sup> B-Zellen, bedingt ist oder eine Ausprägung während der Tumorgenese eingeleitet wird und für den Tumor einen Vorteil darstellt, konnte bisher nicht geklärt werden.

## 1.6. Murine B-1a-Zellen

In der Maus lässt sich neben den beiden Haupt-B-Zelllinien, B-2-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen, eine dritte eigenständige B-Zelllinie anhand der CD5-Ausprägung abgrenzen. Diese B-1a-Zellen unterscheiden sich phänotypisch sowie funktionell von den beiden anderen B-Zell-Populationen. Konventionelle B-2-Zellen (CD5<sup>-</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>low</sup>FSC<sup>low</sup>CD45(B220)<sup>high</sup> (Hardy et al., 2001)), Marginalzonen-B-Zellen und B-1b-Zellen prägen kein CD5 aus, machen den größten Anteil der B-Zellen in der Milz und im PB aus und sind hauptverantwortlich für TD-Immunantworten in GCR. Im Gegensatz dazu sind B-1a-Zellen (CD5<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>high</sup>FSC<sup>high</sup>CD45(B220)<sup>low</sup> (Hardy et al., 2001)) vor allem in der Bauch- und der Brusthöhle ansässig und vermitteln zumeist Immunantworten vom Typ TI-2, benötigen also keine T-Zell-Hilfe und GCR. B-1a-Zellen sezernieren einen konstanten Titer an sogenanntem „natürlichen IgM“ sezernieren ohne durch exogene

Antigene stimuliert worden zu sein, d.h. sie sezernieren „spontan“ IgM (Bos et al., 1988; Haury et al., 1997), wie in keimfrei gehaltenen Mausmodellen gezeigt werden konnte (Lalor et al., 1989). Diese natürlichen IgM-Antikörper zeichnen sich durch eine Nutzung von bestimmten V-Segmenten, nämlich solchen, die J<sub>H</sub>-proximal gelegen sind, und durch eine Keimbahn-ähnliche Zusammensetzung der V-Gen-Segmente aus (Malynn et al., 1990). Letztes bedeutet genauer, dass sie meist IgV-unmutiert sind, also keine Affinitätsreifung in Keimzentren unterlaufen haben, wenige bis keine N-Nukleotide aufweisen und meist nicht klassengewechselt sind (Förster et al., 1988). Das weitgehende Fehlen der N-Nukleotide lässt sich auf die fehlende Ausprägung des Enzyms TdT (engl.: *terminal deoxynucleotidy transferase*) in der fötalen Leber zurückführen, welches für die Generierung von N-Nukleotiden verantwortlich ist (Kantor et al., 1997; Li et al., 1993). Dies spricht für die *de novo* Generierung von B-1a-Zellen bereits und möglicherweise ausschließlich im Fötus. Natürliche Antikörper sind oftmals polyspezifisch und reaktiv für konservierte Strukturen von Pathogenen, die z.B. Influenza oder Pneumonitis auslösen können (Choi et al., 2008; Haas et al., 2005). Zu Antigenen, die besonders gut erkannt werden, gehören Lipopolysaccharide (LPS), Phosphorylcholin (PC) und Phosphatidylcholin (PtC), also unter anderem Zellbestandteile, die z.B. in Bakterien vorkommen (Masmoudi et al., 1990; Pennell et al., 1989; Su et al., 1991).

Neben der Sezernierung von IgM und seltener IgG3 generieren murine B-1a-Zellen außerdem einen Teil der IgA-sezernierenden Plasmazellen in den Schleimhäuten des Darms von neugeborenen Mäusen (Fagarasan et al., 2000).

Paradoxe Weise werden B-1a-Zellen im Verlauf der B-Zell-Entwicklung mit BCRs, die leicht autoreaktiv sind, toleriert, wenn nicht sogar angereichert (Chumley et al., 2000). Dieser Vorgang mag die Beobachtung erklären, dass einige Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythematosus (SLE) mit einem deutlich erhöhten Anteil an B-1a-Zellen einhergehen, wogegen die Existenz von humanen B-1a-Zellen bislang kontrovers diskutiert wird.

B-1a-Zellen zeichnen sich neben ihren besonderen Antikörpern durch weitere Eigenschaften aus. Der Transfer von reifen B-1a-Zellen in neugeborene, immundefiziente Mäuse zeigt, dass B-1a-Zellen unabhängig von HSC bestehen und homöostatisch expandieren können (Förster et al., 1987). Diese Fähigkeit nennt man Selbsterneuerungspotential (engl.: *self renewing capacity*). Ebenfalls wurde postuliert, dass sie besonders effizient T-Zellen aktivieren (Zhong et al., 2007). Während B-2-Zellen durch anti-IgM-Interaktion aktiviert werden, leiten B-1a-Zellen

den Zelltod ein. B-1a-Zellen sind außerdem auf eine konstante, tonische, intrazelluläre Signalweiterleitung, unabhängig von einer BCR-Stimulierung, angewiesen.

Der Anteil an B-1a-Zellen ist in fötalen Mäusen besonders hoch, nimmt aber mit dem Alter ab, während der Anteil an B-2-Zellen steigt. In Neugeborenen lässt sich demnach ein höherer Anteil an B-1a-Zellen als in adulten Tieren nachweisen. Dieser Befund lässt sich durch den Ursprung der beiden Populationen erklären. Transferstudien haben gezeigt, dass HSC aus Knochenmark von adulten Mäusen in immunkompromitierten Mäusen hauptsächlich B-2-Zellen generieren. Werden jedoch HSC aus fötalen Lebern transferiert, so entstehen hauptsächlich B-1a-Zellen (Ghosn et al., 2016; Hardy et al., 1994; Kantor et al., 1993). Entsprechend handelt es sich bei B-1- und B-2-Zellen um zwei verschiedene B-Zelllinien (*Lineage*-Hypothese). Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob der Unterschied in ihrer Entwicklung durch einen anderen Typ der HSC bedingt ist, welcher nur in einem bestimmten Alter vorhanden ist, oder, ob sich HSCs im Laufe des Alters verändern und damit auch die Art der Abkömmlinge beeinflusst wird.

Andere Studien besagen, entgegen der *Lineage*-Hypothese, dass der Phänotyp einer B-1- oder B-2-Zelle nicht durch ihren Ursprung sondern durch ihre Fähigkeit bestimmte Antigene erkennen zu können bestimmt wird (*function-begets-phenotype*-Hypothese) (Clarke et al., 1998; Cong et al., 1991). Demnach werden alle B-Zelltypen von den gleichen Vorläufern generiert. Wenn der einzigartige BCR einer naiven B-Zelle spezifisch durch ein TD-Antigen gebunden wird, nimmt die Zelle den B-2-Phänotyp an und produziert eine TD-Immunantwort. Wenn ein TI-Antigen spezifisch gebunden wird, wird die Zelle den B-1a-Phänotyp ausprägen und TI-Immunantworten generieren. Die *Lineage*-Hypothese wird allerdings allgemein durch fundiertere Studien starker favorisiert.

Zusammengenommen wird die Funktion der B-1a-Zellen mit der spontanen Sekretion von polyreaktiven Antikörpern als eine Art erste Verteidigungslinie bei einer Infektion vor allem in jungen Tieren verstanden. Neugeborene Tiere besitzen noch kein voll ausgebildetes, komplexes Immunsystem, (u.a. werden vor allem mehr  $T_H1$ - als  $T_H2$ -Zellen gebildet). Ebenso fehlt ein immunologisches Gedächtnis, welches schnell und spezifisch Infektionen beseitigen könnte (Gibbons et al., 2014; Raaphorst et al., 1994). Daher sind neugeborene Tiere stärker durch Infektionen gefährdet. Die relativ unspezifische, jedoch schnelle, Immunantwort durch einen konstanten Titer an Antikörpern kann hier essentiell für das Überleben sein. Mit zunehmenden

Immunantworten bildet sich ein kompetentes adaptives Immunsystem, welches theoretisch zunehmend die Funktion der B-1a-Zellen durch spezifischere und effizientere Antworten ersetzt.

Bis heute konnte keine eindeutige B-1a-Zell-Population im Menschen beschrieben werden, obwohl verschiedene humane B-Zell-Phänotypen beschrieben und auf ihre Vergleichbarkeit zu B-1a-Zellen untersucht wurden. Eine Studie beschreibt eine Population mit dem Phänotyp  $CD20^+CD27^+CD43^+CD70^-$  und schlägt diese aufgrund von Ähnlichkeiten in spontaner Antikörpersekretion, tonischem intrazellulären BCR-Signal und T-Zell-Aktivierung als humanes B-1a-Zell-Äquivalent vor (Griffin et al., 2011). Kritiker verweisen allerdings auf ein Zellgemisch in der beschriebenen Population. Zirkulierende Plasmazellen ( $CD20^+CD27^+CD43^+CD38^{high}$ ) könnten damit z.B. für die Sezernierung von Antikörpern verantwortlich sein (Covens, Verbinen, Geukens, et al., 2013; Covens, Verbinen, Jacquemin, et al., 2013; Descatoire et al., 2011; Perez-Andres et al., 2011).

$CD5^+$  B-Zellen wurden bislang als Zellgemisch betrachtet, da  $CD5^+$  transitionelle B-Zellen nicht ausgeschlossen wurden und lediglich B-Zellen aus PB betrachtet wurden. Daher kann keine Aussage über diese Population als möglicher, humaner Gegenspieler zu B-1a-Zellen getroffen werden.

Des Weiteren wurden reife  $CD5^+$  B-Zellen, unter anderem auf Grund von transkriptionellen Ähnlichkeiten, als Ursprung der CLL bestimmt (Seifert et al., 2012).

## 1.7. Ziele der Arbeit

Humane, reife  $CD5^+$  B-Zellen stellen einen wesentlichen Anteil von etwa 10% der PB B-Zellen dar. Außerdem werden sie als Ursprungspopulation der CLL diskutiert und spielen eine Rolle in Autoimmunerkrankungen. Ihre Funktion im gesunden Menschen wurde bisher nur unzureichend untersucht. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit humane, reife  $CD5^+$  B-Zellen phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Besonders soll die Analyse von typischen B-1a-Zell-Eigenschaften an reifen humanen  $CD5^+$  B-Zellen in dieser Arbeit im Fokus stehen, um deren mögliche Rolle als humane B-1a-Lymphozyten zu bewerten. Zu diesen Eigenschaften gehören eine ontogenetisch frühe Entwicklung, spontane Sekretion von natürlichem IgM, die Fähigkeit unabhängig von T-Zell-Hilfe reagieren zu können sowie ein verändertes BCR-Repertoire gegenüber B-2-Zellen. Sukzessive sollen diese und weitere



Eigenschaften für humane, reife CD5+ B-Zellen überprüft und in Zusammenhang gebracht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Gewinnung von Probenmaterial

Die Isolierung der humanen B-Zell-Populationen erfolgt aus PB, Nabelschnurblut und peritonealen Lavagen (laparoskopische Waschflüssigkeit). Die Gewinnung von HSC und Vorläuferzellen geschieht aus Knochenmark, Nabelschnurblut und Apherese nach Stammzellmobilisierung. Die Entnahme und Verwendung erfolgt unter schriftlichem Einverständnis der Spender und einem entsprechenden Votum der lokalen Ethikkommission. Die isolierten HSC und Vorläuferzellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut und Apherese nach Stammzellmobilisierung wurden von dem Institut für Transfusionsmedizin des Uniklinikum Essen isoliert und bereitgestellt.

### 2.2. Isolierung von B-Zell-Populationen aus humanem Gewebe

Die Gewinnung von B-Zell-Populationen aus PB geschieht aus Vollblutspenden oder Buffy Coats gesunder erwachsener und minderjähriger Spender. Außerdem werden B-Zellen aus Nabelschnurblut gewonnen. Hierzu werden mononukleäre Zellen isoliert, indem Vollblut oder Nabelschnurblut in Leucosep-Gefäßen (Greiner Bio One, Frickenhausen) oder isolierten Buffy Coats in Falcon-Gefäße auf Pancoll (Dichte 1,077 g/ml, Pan-Biotech, Aidenbach) überschichtet werden und die zellulären Bestandteile durch Dichtegradientenzentrifugation bei 400 x g für 35-45 min separiert werden. Die PBMCs (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut, engl.: *peripheral blood mononuclear cells*) werden abgenommen. Für die Anreicherung der B-Zellen wird der Pan-B-Zellmarker CD19 und magnetische Zellseparation (MACS®, Miltenyi, Bergisch Gladbach) genutzt. PBMCs werden mit anti-CD19-Antikörpern, gekoppelt an magnetische Mikrobeads (Miltenyi), im Verhältnis 20 µl/10<sup>7</sup> PBMCs für 20 min bei 4°C inkubiert. Überschüssige Mikrobeads werden mit zehnfachem Volumen Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,5% Rinderalbumin (PBS/0,5% BSA) und Zentrifugation bei 400 x g und 4°C für 5 min im Überstand verworfen. Das Sediment wird in 4 ml PBS/0,5% BSA nach Herstellerangaben auf LS-MACS-Säulen aufgetragen, gewaschen und die B-Zell-Fraktion eluiert. Die durchschnittliche Reinheit beträgt hierbei 98%.

CD5<sup>+</sup> B-Zellen werden angereichert, indem Gesamt-B-Zellen unberührt selektiert werden. Dazu werden PBMCs mit einem Antikörpercocktail und Makrobeads

inkubiert, die nicht-B-Zellen (Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen usw.) markieren und durch magnetische Separation von den B-Zellen trennen (EasySep, Stemcell Technologies, Köln). Die Isolation wird nach Herstellerangaben durchgeführt. CD5-exprimierende Zellen werden anschließend mittels anti-CD5-APC-Antikörpern (BD, Biosciences, Heidelberg) und anti-APC-Mikrobeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach) magnetisch von der restlichen B-Zell-Population separiert. Dazu werden B-Zellen mit anti-CD5-ACP-Antikörpern für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, gewaschen und anschließend mit anti-APC-Mikrobeads für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird das Sediment in 4 ml PBS/0,5% BSA aufgenommen und nach Herstellerangaben über LS-MACS-Säulen nach CD5-Ausprägung separiert.

B-Zellen aus peritonealen Lavagen werden von Spenderinnen (18 bis 65 Jahre alt) analysiert, bei denen eine Laparoskopie aufgrund von immunologisch unauffälligen Befunden (Beschwerden wie Kinderlosigkeit oder Verdacht auf Ovarzysten) durchgeführt wurde. Bei diesem Eingriff wird die Bauchhöhle mit 20 – 400 ml Kochsalzlösung oder Ringerlösung gespült. Durch Zentrifugation der Spüllösung bei 400 x g für 5 min werden die enthaltenen Zellen sedimentiert und anschließend werden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (400 x g für 35 min) mononukleäre Zellen aufgereinigt. Es wurden ausschließlich Proben verwendet, welche augenscheinlich nicht eingeblutet waren. Nachträglich wurden Proben von Spenderinnen, die mit malignen Befunden oder Endometriose diagnostiziert wurden, von den regulären Auswertungen ausgeschlossen. Die Probenentnahme wurde durch die Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Essen (Dr. med. Peter Rusch und Dr. med. Peter Kern) durchgeführt.

### **2.3. Durchflusszytometrische Analysen und Zellsortierung**

Für durchflusszytometrische Analysen und Zellsortierung werden B-Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern spezifisch für definierte Oberflächenantigene (selten auch intrazelluläre Antigene) gefärbt. Die Zellen werden in 80 µl PBS/0,5% BSA mit den Antikörpern für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Überschüssige Antikörper werden durch Waschen mit 5 ml PBS/0,5% BSA (bei 400 x g für 5 min) verworfen. Ausprägung von Oberflächenmolekülen, Größe und Granularität der B-Zellen werden durchflusszytometrisch bestimmt (Canto oder LSRII, beide BD Biosciences, Heidelberg), bzw. B-Zell-Populationen für nachfolgende Analysen

sortiert (Aria3 Zellsortierer und BD Diva Software, BD Bioscience, Heidelberg). Die graphischen Auswertungen erfolgten mit den Programmen FlowJo (Ashland, Oregon, USA) und Kaluza (Beckman Coulter, Krefeld).

## 2.4. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlen werden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu werden einer Zellsuspension 10 µl entnommen und in die Zählkammer eingebracht. Falls nötig, wird ein Teil der Suspension zuvor mit PBS/0,5% BSA verdünnt, um auf eine gut zählbare Konzentration der Zellen zu kommen. Mittels Mikroskop werden die Zellzahlen innerhalb von 4 Großquadraten (4 x 4 kleine Quadrate) bestimmt. Mit folgender Formel wird die Zellzahl pro ml der Originalsuspension bestimmt:

$$\frac{(\text{Zellzahl der 4 Großquadrate})}{4} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ml}}$$

## 2.5. Isolierung von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen

In Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin, Uniklinik Essen (PD Dr. Bernd Giebel), wurden hämatopoetische Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisierte Vorläuferzellen aus Apheresaten isoliert. Wie in 2.2 beschrieben werden mononukleäre Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert und mit einem an Microbeads gekoppelten Antikörper inkubiert, der das Oberflächenmolekül CD34, ausgeprägt auf hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen, bindet (CD34-Mikrobeads, Miltenyi). Die Zellzahl wird bestimmt (2.4) und die Reinheit / Zusammensetzung der angereicherten Populationen anhand von publizierten typischen Mustern aus Oberflächenmolekülen charakterisiert (nicht gezeigt).

## 2.6. Humanisierung von NSG-Mäusen mit HSC/Vorläuferzellen

In Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin werden hämatopoetische Stammzellen (HSC) und Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisierte Stammzellen/Vorläuferzellen aus PB isoliert, um durch einen Transfer humanisierte NSG-Mäuse zu erhalten.

Durch Dichtegradientenzentrifugation werden mononukleäre Zellen angereichert (2.2). Wie in 2.5 beschrieben werden die mononukleäre Zellen mit einem an Microbeads gekoppelten Antikörper inkubiert, der das Oberflächenmolekül CD34 erkennt (anti-CD34-Mikrobeads, Miltenyi). Somit werden Zellen selektiert, die diesen Marker tragen, also hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen. Die Zellzahl wird bestimmt (2.4) und die Reinheit der Zellen kontrolliert (>98%, nicht gezeigt). Zwischen  $10^4$  und  $10^5$  Zellen werden in maximal 200  $\mu$ l RPMI-Medium ohne Zusätze in die Schwanzvene einer NSG-Maus injiziert. Die NSG-Mäuse werden 24 Stunden vor Zelltransfer intravenös mit 30 mg/kg Busulfan (Busilvex, Pierre Fabre, Sankt Georgen) behandelt. Durch den zytotoxischen Effekt dient dies der weiteren Eliminierung von murinen Immun- und Stromazellen, um Nischen für die Repopulierung durch die transplantierten Zellen zu schaffen. NSG-Mäuse haben den Genotyp NOD.Cg-*Prkdc*<sup>scid</sup> *Il2rg*<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ und besitzen somit zusätzlich zum NOD-SCID (*non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency*)-Genotyp eine Null-Mutation der *common gamma chain* des Interleukin-2-Rezeptors (IL2R $\gamma$  oder IL2RG). Der Verlust der Interleukin 2 Rezeptor Gamma Kette führt zu einer deutlich verminderten NK-Zell-Entwicklung. Somit bilden NSG-Mäuse stark reduzierte Mengen an B-, T- und NK-Zellen aus, sezernieren weniger Komplementsystem-Faktoren und generieren nur wenige dendritische Zellen. Dies erlaubt eine erhöhte Rekonstituierungseffizienz mit humanen Zellen (Humanisierung) dieser Mäuse, da die Transplantate nur unwesentlich durch murine Immunzellen angegriffen werden. Nach 12 Wochen in keimfreier Haltung werden den Mäusen Milz, Knochenmark, PB, Ileum und Colon entnommen und in PBS/0,5% BSA aufgenommen. Des Weiteren wird eine peritoneale Lavage mit ca. 5 ml PBS/0,5% BSA durchgeführt. Die Mausearbeiten wurden von Michael Möllmann (Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikum, AG Dürig) durchgeführt.

Aus der Milz, dem Knochenmark und der peritonealen Lavage werden B-Zell-Populationen und T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wird die Milz homogenisiert, also eine Zellsuspension erstellt, eine Erythrozytenlyse (1 ml ddH<sub>2</sub>O für 30 Sekunden und anschließend waschen mit 40 ml PBS/0,5% BSA) durchgeführt und in PBS/0,5% BSA aufgenommen. Die Suspensionen werden wie in 2.3 beschrieben mit folgenden Antikörpern gefärbt: anti-CD20-PerCPCy5.5-, anti-CD24-PE-, anti-CD10-FITC-, anti-CD3-PECy7-, anti-CD27-PECy7- (alle BD Biosciences), anti-CD5-APC- (BioLegend) und anti-CD19-PerCPCy5.5-Antikörper (BioLegend).

## **2.7. Bestimmung der Stabilität der Ausprägung von CD5 auf B-Zellen**

Zur Bestimmung der Stabilität der CD5-Ausprägung von CD5<sup>+</sup> B-Zellen und der Induzierbarkeit von CD5 auf naiven B-Zellen werden beide Populationen wie beschrieben aus PB gewonnen und separat in Kultur genommen. 200.000 Zellen in 200 µl RPMI 1640 Medium (Pan BioTech) mit 10% FCS (PAA, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (RPMI/FSC/Pen/Strep) aufgenommen, unstimuliert belassen oder mit 0,03 µg/µl anti-Ig-Antikörpern (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) stimuliert. Über vier Tage werden jeweils 40 µl Suspension entnommen und durchflusszytometrisch für ihre CD5-Ausprägung untersucht. Wie in 2.3 beschrieben werden die Zellen mit anti-CD5-FITC- und anti-CD5-APC-Antikörpern angefärbt.

## **2.8. Bestimmung der Ausprägung von Aktivierungsmarkern**

Zur Bestimmung des Anteils aktivierter B-Zellen werden typische Oberflächenantigene, die nach Aktivierung vermehrt ausgebildet werden, durchflusszytometrisch analysiert. B-Zellen werden aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation und CD19-MACS isoliert und zu jeweils 200.000 Zellen in 200 µl RPMI/FSC/Pen/Strep aufgenommen und entweder unstimuliert oder stimuliert mit 1 µg/ml anti-CD40-HA-Antikörpern und 5 ng/ml anti-HA-Antikörpern (R&D Systems, Minneapolis, USA), 0,03 µg/µl anti-Ig-Antikörpern (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK), oder 3 µM CpG OND Typ B (InvivoGen, San Diego, USA), für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend werden die Oberflächenstrukturen mit anti-CD69-PE-, anti-CD80-PE-, anti-CD25-PE- oder anti-Maus-Isotypkontrolle (IgG2)-PE und anti-CD38-APC-, anti-CD27-PECy7-, anti-CD43-FITC- und anti-CD5-PECy5-Antikörpern (alle BD Biosciences) markiert. Die Oberflächenausprägungen der B-Zell-Populationen werden durchflusszytometrisch analysiert und mit der FlowJo Software ausgewertet.

## **2.9. Korrelation des Anteils an PB CD5<sup>+</sup> B-Zellen mit dem Spenderalter**

Um eine mögliche Korrelation des relativen Anteils humaner, reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen unter der Gesamt-B-Zell-Zahl mit dem Spenderalter zu untersuchen, werden 47

Spendern unterschiedlichen Alters (3 Monate - 89 Jahren) 5 - 14 ml PB abgenommen. B-Zellen werden wie unter 2.2 und 2.3 beschrieben isoliert und mit folgenden Antikörpern gefärbt: anti-IgD-PerCPCy5.5-, anti-CD38-FITC-, anti-CD43-PE-, anti-CD27-PECy7- (alle BD Bioscience) und anti-CD5-APC-Antikörper (Biolegend, Fell). Die B-Zell-Populationen wurden durchflusszytometrisch ausgewertet.

## **2.10. Zellsortierung von B-Zell-Populationen aus Nabelschnurblut**

Zunächst werden B-Zellen aus Nabelschnurblut wie in 2.2 beschrieben isoliert. Zur phänotypischen Charakterisierung der B-Zell-Populationen und zur Sortierung ausgewählter Populationen werden die gewonnen B-Zellen für Durchflusszytometrie wie in 2.3 beschrieben behandelt. Dazu werden die B-Zellen mit anti-CD20-PerCPCy5.5-, anti-CD27-PECy7-, anti-CD10-FITC-, anti-CD24-PE- (alle von BD Bioscience) und anti-CD5-APC-Antikörpern (Biolegend) gefärbt.

## **2.11. Durchflusszytometrische Analyse von humanen peritonealen B-Zell-Populationen**

Isolierte humane mononukleäre Zellen aus peritonealen Lavagen (2.2) werden mit folgenden Antikörpern wie zuvor beschrieben (2.3) inkubiert: anti-CD20-FITC-, anti-CD5-APC-, anti-CD3-PeCy7-, anti-CD27-PeCy7-, anti-CD43-PE-Antikörper. Anschließend werden die Proben durchflusszytometrisch analysiert und teilweise sortiert.

## **2.12. Aufreinigung genomischer DNA**

Die DNA-Isolierung aus sortierten Zellen erfolgt durch Isopropanol-Fällung mit dem Gentra Puregene Core Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Zusammengefasst wird das Zellsediment mit 100 µl Zelllysepuffer versetzt. Dann werden 30 µl Proteinfällungslösung hinzugefügt, gründlich gemischt (Vortexer) und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) sedimentieren die Proteine. Zur Erhöhung der Reinheit der DNA wird nach erneuter Inkubation für 5 min auf Eis der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand, der die gelöste genomische DNA enthält, wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit 100 µl Isopropanol überführt. Dieser Mischung wird 1 µl

Glycogen (Thermo Fisher Scientific, Oberhausen) als Präzipitationshilfe zugesetzt, vermischt und die DNA bei 13.000 x g für 2 h bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wird mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl ddH<sub>2</sub>O für mindestens 1 h resuspendiert (Thermomixer).

### 2.13. Auswertung von Transkriptionsprofilen

Die Daten zur globalen Genausprägung von CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen wurden im Rahmen bereits publizierter Arbeiten (Seifert et al., 2012) generiert. In dieser Arbeit wurden die Transkriptionsprofile von CD5<sup>+</sup> B-Zellen mit naiven und Gedächtnis-B-Zell-Populationen sowie CLL-Zellen verglichen. In der vorliegenden Dissertation wurden diese Daten aufgegriffen und für einen vertiefenden Vergleich von ausschließlich reifen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen verwendet.

Kurz zusammengefasst wurden die Genausprägungsprofile wie folgt erstellt. Die RNA wurde aus 10.000 Zellen mit dem Gentra Purescript Protokoll (Gentra, Qiagen) isoliert. Die Qualität der RNA wurde durch den Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Ratingen) ermittelt. Proben mit einem Integrity-Wert >9 wurden mit dem MessageAmp II RNA amplification Kit und dem MessageAmp II Biotin Enhanced Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific) weiter prozessiert. In ausgewählten Batches wurden HG U133 2.0 Plus Arrays mit den Proben hybridisiert und mit dem GeneChip Scanner 3000 7G ausgelesen (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA). Batchkorrekturen wurden mittels ComBat Software durchgeführt (Johnson et al., 2007). Die Transkriptionsprofile wurden mittels Vsn-Normalisierung, per-gene-quantile Normalisierung bearbeitet und es wurden paarweise Vergleiche, Gengruppen-Anreicherungsanalysen (engl.: *gene set enrichment analysis*, GSEA) und Ingenuity-Pathway-Analysen für Datensätze der reifen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen durchgeführt.

### 2.14. Analyse von IGHV-Gen-Umlagerungen humaner B-Zell-Populationen

Zur Analyse der klonalen Verwandtschaft von B-Zell-Populationen sowie zur Ermittlung von Mutationsstatus und V<sub>H</sub>-Gen-Verwendung werden die rearrangierten schweren Ketten des Ig-Gens (V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>) aus genomischer DNA von sortierten B-Zellpopulationen mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain*



*reaction*, PCR) amplifiziert und sequenziert. Dies geschieht entweder durch Amplifizierung gefolgt von Klonierung und Sanger-Sequenzierung oder durch Amplifizierung mit anschließender massiv-paralleler Tiefensequenzierung (engl.: *next generation sequencing*, NGS).

### 2.14.1. **V<sub>H</sub>-PCR, Klonierung und Sanger-Sequenzierung**

#### 2.14.1.1. V<sub>H</sub>-PCR

Aus der genomischen DNA sortierter B-Zellen werden die V<sub>H</sub>-Gen-Umlagerungen mittels PCR amplifiziert. Es werden Primer genutzt, die spezifisch für die FRI-Region der V<sub>H</sub>-Gene bzw. die J<sub>H</sub>-Regionen sind. Somit werden Produkte von einer Länge von ca. 300 bp generiert, die Informationen über den Mutationsstatus eines Großteils der V<sub>H</sub>-Region, die Segmente der Genumlagerung und die vollständige Sequenz der CDRIII enthalten. Die V<sub>H</sub>-Gen-PCR wird in zwei Runden mit einseitig eingerückten Primern in der zweiten PCR (engl.: *semi-nested* PCR) durchgeführt. Dieses Vorgehen vermindert die wiederholte Amplifikation von unspezifischen Produkten aus der ersten PCR. In beiden PCRs werden V<sub>H</sub>-Gen-Familien-spezifische Primer, die in der FRI binden, eingesetzt. Zudem wird ein Primer-Gemisch für die sechs J<sub>H</sub>-Segmente hinzugefügt. Die erste PCR erfolgt als sogenannter Multiplex-Ansatz, d.h. der Reaktion werden alle Primer spezifisch für je eine V<sub>H</sub>-Familie (V<sub>H</sub>1 – V<sub>H</sub>6) und eine J<sub>H</sub>-Primer Mischung für alle J<sub>H</sub>-Gen-Segmente zugesetzt. Somit können die umgelagerten IGHV-Gene dieser V<sub>H</sub>-Familien (von bis zu zwei Allelen jeder Zelle) simultan amplifiziert werden. In der zweiten PCR werden die V<sub>H</sub>-Gen-Familien in separaten Reaktionen amplifiziert. Zur Kontrolle der PCRs werden Wasserkontrollen als Negativ-Kontrolle und genomische DNA von Zelllinien mit bekannten IGHV-Gen-Umlagerungen parallel amplifiziert. Neben den Kontrollen der ersten Runde werden ebenfalls Wasserkontrollen und Positivkontrollen mit 100 ng genomischer DNA von CD19<sup>+</sup> B-Zellen in der zweiten PCR parallel amplifiziert.

PCR-Protokoll: 1. Runde V<sub>H</sub>-Gen-PCR

PCR-Ansatz	3 µl	2 mM dNTPs
	3 µl	10x PCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> (Expand High Fidelity, Roche, Basel, Schweiz)
	6 µl	Primer Mischung V <sub>H</sub> 1-6 und 3'J <sub>H</sub> 1-6
	2,7 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Expand High Fidelity, Roche)
	x µl	Genomische DNA
	Add 30 µl	ddH <sub>2</sub> O
Polymerase	0,3 µl	DNA-Polymerase-Mix (Expand High Fidelity, Roche)
PCR-Programm	95°C 3 min, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min, 35x (95°C 50 sec, 63°C 30 sec, 72°C 60 sec), 72°C 5 min, 15°C Pause	
Primer Mischung	je 1 µl einer 250 µM Primerlösung von: V <sub>H</sub> 1-6 und 3'J <sub>H</sub> 1,2,4,5; 3'J <sub>H</sub> 3; 3'J <sub>H</sub> 6; versetzt mit 241 µl 10 mM Tris-HCL-Puffer (1 µM Endkonzentration)	

PCR-Protokoll: 2. Runde V<sub>H</sub>-Gen-PCR

Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen beziehen sich auf die jeweiligen V<sub>H</sub>-Primer (Bräuninger et al., 1999; Klein et al., 1995; Küppers et al., 1993)

PCR-Ansatz	5 µl	2 mM dNTPs
	5 µl	10x PCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> (Expand High Fidelity, Roche)
	2,5 µl	Einer der V <sub>H</sub> -Primer
	2,5 µl	5'J <sub>H</sub> 1-6 Primermischung
	3 bzw. 5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Expand High Fidelity, Roche) (5 µl für V <sub>H</sub> 3-5; 3 µl für V <sub>H</sub> 1 und V <sub>H</sub> 6)
	1 µl	Produkt der 1. Runde
	add 50 µl	ddH <sub>2</sub> O
Polymerase	0,3 µl	DNA-Polymerase-Mix (Expand High Fidelity, Roche)
PCR-Programm	95°C 3 min, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min, 35x (95°C 50 sec, 61°C 30 sec, 72°C 60 sec), 72°C 5 min, 15°C Pause	
Primermischung	1 µl einer 250 µM Primerlösung von einem der V <sub>H</sub> 1-6 Primer versetzt mit 99 µl 10 mM Tris-HCL-Puffer (2,5 µM Endkonzentration)	
	je 1 µl einer 250 µM Primerlösung von 5'J <sub>H</sub> 1,4,5; 5'J <sub>H</sub> 2, 5'J <sub>H</sub> 3; 5'J <sub>H</sub> 6 versetzt mit 99 µl 10 mM Tris-HCL-Puffer (2,5 µM Endkonzentration)	

Primersequenzen:

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'
V <sub>H</sub> 1 FR1	5'-CAG-TCT-GGG-GCT-GAG-GTG-AAG-A-3'
V <sub>H</sub> 2 FR1	5'-GTC-CTR-CGC-TGG-TGA-AAC-CCA-CAC-A-3'
V <sub>H</sub> 3 FR1	5'-GGG-GTC-CCT-GAG-ACT-CTC-CTG-TGC-AG-3'
V <sub>H</sub> 4 FR1	5'-GAC-CCT-GTC-CCT-CAC-CTG-CRC-TGT-C-3'
V <sub>H</sub> 5 FR1	5'-AAA-AAG-CCC-GGG-GAG-TCT-CTG-ARG-A-3'
V <sub>H</sub> 6 FR1	5'-ACC-TGT-GCC-ATC-TCC-GGG-GAC-AGT-G-3'
3'J <sub>H</sub> 1,2,4,5	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-3'
3'J <sub>H</sub> 3	5'-ACC-TGA-AGA-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-3'
3'J <sub>H</sub> 6	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-3'
5'J <sub>H</sub> 1,4,5	5'-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-KCC-CTG-GCC-3'
5'J <sub>H</sub> 2	5'-GAC-AGT-GAC-CAG-GGT-GCC-ACG-GCC-3'
5'J <sub>H</sub> 3	5'-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-CCC-TTG-GCC-3'
5'J <sub>H</sub> 6	5'-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-CCC-TTK-GCC-3'

2.14.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wird ein 2% Agarosegel in 150 ml Tris-Acetate-EDTA (TAE)-Puffer hergestellt. Die PCR-Produkte werden mit jeweils 6x Ladepuffer (Orange Loading Dye, Fermentas, Thermo Scientific) versetzt und aufgetragen. Die Trennung erfolgt über das Anlegen einer Spannung von 5 V/cm über einen Zeitraum von etwa 60 min. Zur Visualisierung der DNA unter Ultraviolett (UV)-Bestrahlung wird dem Agarosegel GelRed (Biotium, Fremont, Californien, USA) beigemischt. GelRed ist ein UV-Licht-anregbarer Farbstoff, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Eine DNA-Leiter (O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas) dient der Abschätzung der Größe von PCR-Produkten. Als Laufpuffer wird 1x TAE-Puffer verwendet. Produkte erwünschter Größe werden ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.14.1.3. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte, ausgeschnitten aus dem präparativen Agarosegel, werden mithilfe des innuPREP DOUBLEpure Kits (Analytik Jena, Jena) aus dem Agarosegel nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zunächst wird die Agarose durch Zugaben von 650 µl Gel Solubilizer bei 50°C für 10 min und wiederholtem Vortexen gelöst. Bevor die Lösung auf die Spin Columns gegeben wird, werden 50 µl Binding Optimizer

hinzugegeben und gut vermischt. Die DNA bindet an die integrierte Membran, unerwünschte Bestandteile werden durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 1 min diese Membran passieren und verworfen. Die DNA wird zweifach mit 700 ml Washing Solution gewaschen (10.000 x g für 1 min). Da die Lösung Ethanol enthält, welches in weiteren Reaktionen störend wirken kann, wird die Säule in ein weiteres Sammelgefäß gegeben und bei 10.000 x g für 2 Min. zentrifugiert. Die gebundene DNA wird mit 30 µl Elutionspuffer (vorgewärmt auf 50°C) für 1 min bei RT inkubiert und anschließend in ein frisches Eppendorfgefäß eluiert (8.000 x g für 1 min).

#### 2.14.1.4. Ligation der PCR-Produkte

Um IGHV-Umlagerungen aus einer B-Zell-Population voneinander separiert analysieren zu können, wird eine Ligation der PCR-Produkte mit darauffolgender Transformation in Bakterien und Sequenzierung durchgeführt. Dabei wird das Produktgemisch in Vektoren eingebracht (ligiert). Diese werden in Bakterien transformiert und diese anschließend expandiert und mit antibiotikahaltigen Medien selektiert. Durch die Vermehrung wird ausreichend Material gewonnen, um die Plasmide isolieren und sequenzieren zu können.

Die PCR Produkte werden mittels des pGEM®-T Easy Vector System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) im folgenden Ansatz in den pGEM-T Easy Vektor ligiert. Die eingesetzte Produkt-Menge errechnet sich durch die Länge des PCR-Produkts.

$$\frac{\text{ng des Vektors} \times \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} * \left( \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right) \text{molekulares Verhältnis} \\ = \text{ng des Inserts}$$

$$\frac{50 \text{ ng des Vektors} \times \text{kb Größe des Inserts}}{3,0 \text{ kb Größe des Vektors}} * \left( \frac{3}{1} \right) \text{molekulares Verhältnis} = \text{ng des Inserts}$$

Ligationsansatz	5 µl	2x Rapid Ligations-Puffer
	1 µl	pGEM-T Easy Vektor (50 ng)
	1 µl	T4 DNA-Ligase
	x µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
	add 10 µl	ddH <sub>2</sub> O

Der Ansatz wird bei 4°C über Nacht inkubiert.

#### 2.14.1.5. Transformation und Expansion von Bakterien

Zur Klonierung eines einzelnen PCR-Produkts wird dieses in kompetente Bakterien transformiert. Die Bakterien werden kultiviert und die Plasmide anschließend isoliert und sequenziert.

Für den Transformationsansatz werden 10 µl der pro5alpha Bakterien (*Escherichia coli* kompetente Zellen, Promega) und 3 µl des Ligationsansatzes in ein vorgekühltes 1,5 ml Gefäß auf Eis gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec. Der Ansatz wird für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 200 µl SOC-Medium (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) in einem 12 ml Gefäß vermischt. Nach 50 min Inkubation bei 37°C und Rotation (250 rpm) werden 100 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten (mit 100 µl Ampicillin), die mit 100 µl Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG, 100 mM, Roth, Karlsruhe) und 50 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal, Roth) behandelt wurden, ausgestrichen. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert und am Folgetag für mindestens eine Stunde bei 4°C gekühlt. An der Position zur Insertion des PCR-Produkts im Plasmid ist das Gen für eine β-Galactosidase (*lacZ*-Gen) enthalten. Wird der Vektor ohne Insertion eines Produkts ligiert, so wird die β-Galactosidase synthetisiert und spaltet X-Gal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Wird ein Produkt inseriert, so wird das Gen für die β-Galactosidase zerstört. Damit bleiben die Bakterien weiß. Mithilfe der Blau-Weiß-Selektion können also weiße Kolonien, d.h. solche, die ein Plasmid mit inseriertem PCR-Produkt enthalten, gewählt werden.

Ausgewählte Kolonien werden separat in 2 ml Luria broth Medium (LB mit 1 ml/L Ampicillin) in 12 ml Gefäßen bei 37°C und Rotation (250 rpm) über Nacht vermehrt. Am Folgetag werden aus dem Ansatz die Plasmide mithilfe des mi-Plasmid miniprep Kits (Metabion, Martinsried) nach Herstellerangaben isoliert.

#### 2.14.1.6. Sequenzierung nach Sanger

Die Sanger-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der Replikation mit Kettenabbruch. Das DNA-Template wird hierbei mittels eines einzelnen Primers linear amplifiziert. Die Besonderheit liegt im Einsatz von sogenannten Abbruchnukleotiden. Diese ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) besitzen im Gegensatz zu den ebenfalls eingesetzten dNTPs keine OH-Gruppe an der C3 Position der Ribose und machen eine weitere Elongation unmöglich. Die Abbruchstellen können den einzelnen Basen aufgrund der Kopplung der

verschiedenen ddNTPs an jeweils eines von vier fluoreszierenden Farbstoffen zugeordnet werden. Willkürlich werden in jedem Elongationszyklus die ddNTPs eingebaut, die Elongation des jeweiligen Produktes dadurch abgebrochen und die Base an der entsprechenden Position erhält eine definierte „Farbe“. Das Gemisch aus unterschiedlich langen Molekülen mit den jeweils farblich markierten Endpunkten wird anschließend durch einen geeigneten Sequenzierer mit einem Laser angeregt und detektiert. Aus der Reihenfolge der Signale ergibt sich die Sequenz des Templates. Das Desoxy Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit wurde verwendet (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt)

#### 2.14.1.7. Protokoll für die Sequenzreaktion:

Reaktionsansatz	0,5 µl	BigDye
	3,75 µl	6x Sequenzierpuffer
	0,75 µl	V <sub>H</sub> -Primer (V <sub>H</sub> 1-6, 3,2 pmol Endkonzentration)
	x µl	Aufgereinigtes Klonierungsprodukt (ca. 20 ng)
	add 10 µl	ddH <sub>2</sub> O

Thermocycler	95°C 5 min, 24x (95°C 15 sec, 50°C 10 sec, 60°C 4 min), 15°C
Programm	Pause

Für die Sequenzierung wird das Produkt der Sequenzreaktion sedimentiert. Mittels Ethanolfällung werden störende Reagenzien im Überstand entfernt und die DNA konzentriert. Dem Sequenzieransatz werden 40 µl dH<sub>2</sub>O, 150 µl 100% Ethanol und 6 µl 1,5 M NaOAc/Dextranblau zugesetzt. Anschließend wird das Gemisch bei 10.000 x g für 30 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen (10.000 x g für 10 min bei RT) und bei RT getrocknet. Vor dem Auftragen wird die DNA in 10 µl Formamid aufgenommen, durch kurzes Erhitzen bei 95°C denaturiert und mit einem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) ausgelesen.

Die Auswertung der V<sub>H</sub>-Sequenzen geschieht mit Hilfe von Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien) und der freien Datenbank-Software IMGT-Quest (Lefranc, 2003). Chromas Lite stellt die Sequenzierdaten in Form von Elektropherogrammen dar. IMGT-V-Quest ermöglicht den Abgleich der gewonnen Sequenz mit den bekannten V<sub>H</sub>-, D<sub>H</sub>- und J<sub>H</sub>-Segmenten und deren Zuordnung sowie die Bestimmung des Mutationsstatus der V<sub>H</sub>-Region. Des Weiteren

können über den Grad der Homologie der CDRIII verschiedener Sequenzen Schlüsse über die Verwandtschaft der Ursprungzellen gezogen werden.

### 2.14.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Konzentrationen werden mittels Nanodrop ND-1000 Mikrovolumenspektrometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) nach Herstellerangaben aus 1 µl DNA-Lösung bestimmt. Die DNA-Konzentrationen der aufgereinigten PCR-Produkte und der isolierten Plasmide werden semi-quantitativ bestimmt. Dazu werden 2 µl der PCR-Produkte mit 2 µl 6x Ladepuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (2% Agarose) aufgetrennt. Als Marker dient der Mass Ruler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Dieser ergibt nach Gelelektrophorese ein definiertes Bandenmuster von Produkt-Größen und DNA-Konzentrationen und somit einer definierten Leucht-Intensität unter UV-Bestrahlung. Unter Berücksichtigung des eingesetzten Produktvolumens kann die Konzentration der Proben geschätzt werden.

### 2.14.3. Quantitative IGHV-Tiefensequenzierung

Eine Teilaufgabe dieser Arbeit ist die Entwicklung eines PCR-Ansatzes mit dem IGHV-Gen-Umlagerungen einer großen Anzahl an B-Zellen parallel amplifiziert und anschließend mittels Illumina-Tiefensequenzierung ausgewertet werden können (eng. *next generation sequencing*, NGS). Diese PCR ist in mehrere Schritte gegliedert. Im ersten Schritt werden theoretisch beide DNA-Stränge der rearrangierten V<sub>H</sub>-Gene in genau zwei PCR-Zyklen jeweils einmal abgeschrieben, wobei familienspezifische V<sub>H</sub>-Primer, die in der FRII des V<sub>H</sub>-Gens binden, und ein Konsensus-J<sub>H</sub>-Primer, der die verschiedenen J<sub>H</sub>-Segmente binden kann, verwendet werden. Die Besonderheit ist hierbei, dass jedes einzelne V<sub>H</sub>-Primermolekül eine Sequenz von zwölf willkürlichen Nukleotiden (engl.: *unique molecular identifier*, UMI) trägt, und somit den jeweiligen Strang einzigartig markiert. Anschließend werden die überzähligen V<sub>H</sub>- und J<sub>H</sub>-Primer durch einen Exonukleaseverdau entfernt und die Produkte mit einem weiteren Primerpaar über 40 PCR-Zyklen amplifiziert. Die letzteren Primer (engl.: *universal adapter*, UA, und *index adapter*, IA) binden je eine Sequenz, die für alle Produkte gleichermaßen durch das erste Primerpaar angefügt wurde. Das zweite Primerpaar verlängert die Produkte wiederum um sogenannte

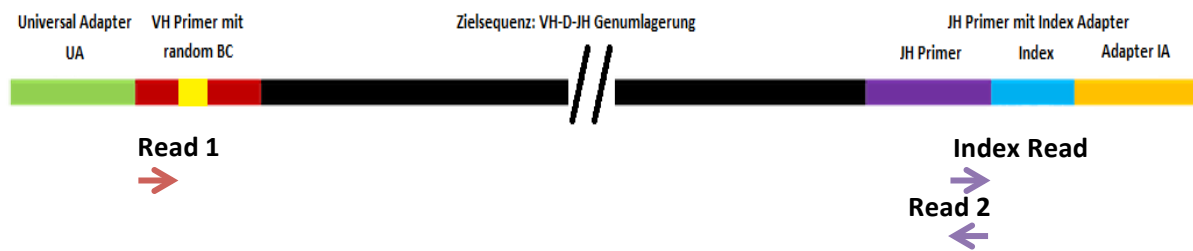


DNA-Adapter, die eine Hybridisierung und Sequenzierung mittels Illumina-NGS erlauben. Außerdem ist der IA-Primer mit einem Index versehen, der aus sechs aufeinanderfolgenden, bekannten Nukleotiden besteht und als Probenindex fungiert. Die derart erstellte Produktbibliothek (eng.: *Library*) wird mittels Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. Die so erstellten Libraries werden mit einem MiSeq (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA) ausgelesen. Zur Illumina-NGS werden Primer für die sogenannten Reads 1 und 2 sowie Index-Read (d.h. Strang, Gegenstrang und Index werden in separaten Reaktionen ausgelesen) eingesetzt (siehe Abbildung 2). Die ausgegebenen Sequenzen werden bioinformatisch in Kooperation mit dem Institut für Bioinformatik an der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. Daniel Hoffmann) ausgewertet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass der UMI während der Amplifikation zusammen mit dem Zielfragment vervielfältigt wird. Dies bewirkt, dass auch nach mehreren Amplifikationsschritten weiterhin unterschieden werden kann, ob mehr als zwei identische V<sub>H</sub>-Moleküle aus der Amplifikation eines Ursprungsmoleküls oder aus wenigstens zwei Zellen stammen (Die Limitierung auf mehr als zwei V<sub>H</sub>-Moleküle bzw. wenigstens zwei Zellen ergibt sich aus der Tatsache, dass initial sowohl Strang als auch Gegenstrang eines einzelnen Templates mit jeweils einzigartigem UMI amplifiziert werden können, d.h. aus einem Template können Amplifikate mit bis zu zwei verschiedenen UMIs generiert werden). Außerdem müssen Sequenzen, die identische UMIs tragen, dieselbe V<sub>H</sub>-Gen-Sequenz besitzen, da sie einem Ursprungsmolekül entspringen. Dadurch können fehlerhaft eingefügte Nukleotidaustausche während der PCR oder der Sequenzierung durch Vergleich mit zusätzlichen Molekülen mit identischem UMI identifiziert und eliminiert werden.

Schließlich ist eine Quantifizierung der analysierten Zelläquivalente mittels der UMIs möglich. PCR-Duplikate können kalkuliert werden und somit die Zellzahl der analysierten Population bestimmt werden, so dass IGHV-Segment-Nutzung, Mutationsstatus und klonale Verwandtschaft sehr genau quantifiziert werden können.

Rearrangierte V<sub>H</sub>-Gene werden von Primern amplifiziert, welche in der FR<sub>II</sub> eines V<sub>H</sub>-Segments der Familien V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4 und im J<sub>H</sub>-Segment binden. Dies führt zu einer Länge des amplifizierten Produkts von 300 bis 400 Basen. Mittels verschiedener Indizes an den jeweiligen Adaptermolekülen können PCR-Produkte verschiedener Proben parallel sequenziert werden.

Nach der Erstellung dieser PCR-Produkt-Bibliotheken, folgt die Tiefensequenzierung.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des PCR-Produkts zur Tiefensequenzierung**

2.14.3.1. Die Reaktion wird wie folgt im Doppelansatz angesetzt.

PCR-Protokoll:

Reaktionsansatz	I)	4,5 µl	2 mM dNTPs
		4,5 µl	10x Expand High Fidelity Puffer
		0,5 µl	V <sub>H</sub> 1 Primer (10 µM)
		0,5 µl	V <sub>H</sub> 3 Primer (10 µM)
		0,5 µl	V <sub>H</sub> 4 Primer (10 µM)
		0,5 µl	J <sub>H</sub> _consensus Primer (10 µM)
		2,7 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
		9 µl	Betain
		X µl	gDNA (150 ng)
		0,3 µl	Expand High Fidelity Polymerase Mix
		Add 45 µl	
	II)	3 µl	Exonuklease I (New England Biolabs, Ipswich, Maine, USA)
	III)	1 µl	UA Primer (10 µM)
		1 µl	IA Primermischung (IAx_5'J <sub>H</sub> 1,4,5, IAx_5'J <sub>H</sub> 2, IAx_5'J <sub>H</sub> 3, IAx_5'J <sub>H</sub> 6) (10 µM)

Thermocycler Programm	I)	95°C 1 min, 95°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min, 2x (95°C 50 sec, 65°C 30 sec, 72°C 60 sec), 72°C 5 min, 15°C Pause
	II)	(Zugabe der Exonuklease I) 37°C 30 min, 80°C 20 min, 95°C 5 min
	III)	95°C Pause (Zugabe der Primer UA und IA), 72°C 1 min, 40x (95°C 50 sec, 64°C 30 sec, 72°C 60 sec), 72°C 5 min, 15°C Pause

Primersequenzen:

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'
VH1_FR2_BC	CGACGTAAAACGACGGCCAGT <b>NNNNNNNNNN</b> CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
VH3_FR2_BC	CGACGTAAAACGACGGCCAGT <b>NNNNNNNNNN</b> GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
VH4_FR2_BC	CGACGTAAAACGACGGCCAGT <b>NNNNNNNNNN</b> GGAAGGGVCTGGAGTGGATTGGG
JH_cons_BC	CACACAGGAAACAGCTATGACCATGCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
UA	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACCGACGTAAAACGACGGCCAGT
IA2_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CGATGT</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA2_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CGATGT</b> CTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA2_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CGATGT</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA2_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CGATGT</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA3_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TTAGGC</b> TTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA3_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TTAGGC</b> TTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA3_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TTAGGC</b> TTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA3_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TTAGGC</b> TTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA4_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TGACCA</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA4_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TGACCA</b> CTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA4_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TGACCA</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA4_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TGACCA</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA5_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACAGTG</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA5_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACAGTG</b> CTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA5_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACAGTG</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA5_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACAGTG</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA6_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GCCAAT</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA6_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GCCAAT</b> CTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA6_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GCCAAT</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA6_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GCCAAT</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA7_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CAGATC</b> TTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA7_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CAGATC</b> TTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA7_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CAGATC</b> TTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA7_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CAGATC</b> TTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC

IA8_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACTTGACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA8_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACTTGACTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA8_5' JH3-	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACTTGACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA8_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ACTTGACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA9_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GATCAGCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA9_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GATCAGCTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA9_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GATCAGCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA9_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GATCAGCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA10_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TAGCTTCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA10_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TAGCTTCTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA10_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TAGCTTCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA10_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TAGCTTCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA11_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GGCTACCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA11_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GGCTACCTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA11_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GGCTACCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA11_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GGCTACCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA12_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CTTGTA</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA12_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CTTGTA</b> CTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA12_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CTTGTA</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA12_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CTTGTA</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA13_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTCAACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA13_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTCAACTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA13_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTCAACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA13_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTCAACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA14_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA14_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA14_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA14_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGTTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA15_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ATGTCACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA15_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ATGTCACTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA15_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ATGTCACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA15_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ATGTCACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA16_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CCGTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA16_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CCGTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA16_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CCGTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA16_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CCGTCCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA17_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTCCGCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA17_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTCCGCCTT</b> ACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA17_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTCCGCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
IA17_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTCCGCCTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA18_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGAAACTT</b> ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC

IA18_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGAA</b> ACTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA18_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGAA</b> ACTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGCC
IA18_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGAA</b> ACTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA19_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGGC</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA19_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGGC</b> CTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA19_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGGC</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGCC
IA19_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTGGC</b> CTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
IA20_5' JH1,4,5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTTTC</b> GCTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
IA20_5' JH2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTTTC</b> GCTTACCTGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
IA20_5' JH3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTTTC</b> GCTTACCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGCC
IA20_5' JH6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GTTTC</b> GCTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC

Die Sequenzierung wird auf der MiSeq Plattform (Illumina) durchgeführt. Für Read 1 und Read 2 sowie den Index Read wurden Sequenzierprimer entworfen, die eine Sequenzierung direkt ab dem UMI erlauben. Dadurch verkürzt sich der zu sequenzierende Abschnitt, welcher nunmehr durch einen Lauf über 300 bp vollständig abgedeckt werden kann. Sequenziert wird der Originalstrang, sowie der Gegenstrang, der Probenindex wird separat in einem dritten Sequenzierschritt ausgelesen.

Laufbedingungen: MiSeq Rapid run, 2x 300 bp, custom primer

#### Anwendungsspezifische Sequenzierprimer:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Oligonukleotidsequenz 5' → 3'</u>
Seq Primer Read 1 (R1)	TACACCGACGTAAAACGACGGCCAGT
Seq Primer Read 2 (R2)	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC
Seq Primer Index Read (Index)	GGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG

#### 2.14.3.2. Bioinformatische Auswertung von IGHV-Genen aus der Tiefensequenzierung

Zunächst werden zusammengehörige Read 1 und Read 2 zusammengelegt. Sequenzen müssen folgende Qualitätsmerkmale erfüllen, um in die Analyse eingeschlossen zu werden: Der durchschnittliche Qualitätswert der gesamten Sequenz muss mindestens 25 und der Qualitätswert der einzelnen Nukleotide mindestens 30 betragen. Da im Fall der Sequenzierung von Proben-Set#1 und Set#2 (siehe Ergebnisse) Read 2 eine allgemein schlechte Qualität auswies, wurde dieser nicht in die weiteren Analysen eingeschlossen. Für Set#3 (siehe

Ergebnisse) erfolgte eine Zusammenlegung von Read 1 und Read 2. Nicht komplementäre Nukleotide wurden durch „N“ ersetzt. Sequenzen mit identischem UMI werden als technische Duplikate durch PCR-Amplifikation gewertet und zu einer Sequenz reduziert (entspricht der längsten enthaltenen Sequenz). „N“-Nukleotide werden, wenn möglich, durch das korrekte Nukleotid ersetzt, welches den anderen Sequenzen dieses Clusters an dieser Position entnommen werden kann. Nur Cluster, die mehr als eine Sequenz enthalten, werden weiter bearbeitet. Somatische Mutationen innerhalb des V-Gens werden durch Homologie-Abgleich (*Alignment*) zu IGHV-Gen-Segmenten bestimmt und gezählt. Als Referenz werden IGHV-Gensequenzen genutzt, die in der IMGT-Datenbank hinterlegt sind.

Die IGHV-Zuordnung erfolgt mittels *Alignment* der Sequenzen zu IGHV-Gensegmenten durch BLAST. Die CDRIII-Länge wird von dem TATTACTGT-Motiv bis zum TGGGGC-Motiv gezählt, wobei ersteres von der Zählung ausgeschlossen und letzteres bis einschließlich TGG eingeschlossen wurde. Klone werden als solche gezählt, wenn Sequenzen aus zwei biologischen Replikaten dasselbe IGHV-Gensegment, eine CDRIII-Längenvarianz von maximal 5% und eine Homologie von mindestens 98% aufweisen.

## 2.15. Analyse von IgM-Sekretion und intrazellulärem IgM

### 2.15.1. ELISpot-Assay

ELISpot-Assays zur Detektion von humanem, sezernierten IgM wurden mithilfe des ELISpot Plus Kits für humanes IgM (MabTech, Macleod, Australien) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden die Membranen mit 50 µl 70% Ethanol für 2 Minuten angefeuchtet, dann fünfmal mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit 100 µl/Membran des "*coating*" anti-IgM-Antikörpers (10 µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membranen werden anschließend fünfmal mit PBS gewaschen und dann mit 250 µl PBS/20% BSA für 2 Stunden geblockt. Nach Verwerfen des PBS/20% BSA wird die Zellsuspension (20.000 Zellen in 100 µl RPMI-Medium pro Reaktion) aufgetragen. Nach 16 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Membranen fünfmal mit PBS gewaschen. 100 µl des "*detection*"-Antikörpers (anti-IgM-Biotin-Antikörper, 1 µg/ml) werden pro Membran aufgetragen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wird fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend jede Membran mit 100 µl Streptavidin-ALP (1:1000 in PBS/0,5%

FCS) versetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT werden die Membranen fünfmal mit PBS gewaschen, 100 µl der ready-to-use Substratlösung (BCIP/NBT-plus) zugegeben und mit Wasser ausgewaschen sobald Spots sichtbar werden. Nach Trocknen der Membranen werden die Spots mit einem ELISpot-Lesegerät (ELISpot Reader System, Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg) quantifiziert.

### **2.15.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Bestimmung aktiver IgM-Sezernierung in B-Zellen werden diese intrazellulär mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Aus Vollblutspenden werden B-Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS mit CD19-Selektion isoliert. Die Zellen werden extrazellulär mit anti-CD5-PerCPCy5-Antikörpern (BD BioSciences) gefärbt (wie in 2.3 beschrieben). Für intrazelluläre Färbungen werden die Zellen mittels Cytofix/Cytoperm-Kit (BD BioSciences) nach Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert. Kurz beschrieben werden bis zu  $10^6$  Zellen in 250 µl Cytofix für 12 min bei RT fixiert, anschließend für 10 min bei RT mit 1 ml PermWash gewaschen und zentrifugiert ( $350 \times g$  für 7 min, RT). Das Sediment wird resuspendiert und in 60 µl PermWash mit 20 µl anti-IgM-FITC-Antikörpern für 1 Stunde im dunklen bei RT inkubiert. Für weitere 5 min wird 1 µl Hoechst-Farbstoff (Thermo Fisher Scientific) für die Kernfärbung dazugegeben. Nach einem weiteren Waschschriff mit PermWash werden die Zellen in 20 µl ddH<sub>2</sub>O. aufgenommen. 5 bis 10 µl der Zellsuspension werden mit 10 µl Eindeckmedium (Fluorescence Mounting Medium, Dako, Hamburg) gemischt und 5 µl davon auf einem Objektträger mit einem Deckgläschen fixiert. Die Zellen werden mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica Microsystems, Mannheim) analysiert.

### **2.16. Bestimmung von Proliferation in B-Zell-Populationen**

Zur Bestimmung von Proliferation werden B-Zellen aus Buffy Coats oder Vollblut isoliert und sortiert. Bis zu  $2,5 \times 10^5$  B-Zellen werden in 150 µl RPMI/FCS/Pen/Strep aufgenommen und mit 100 IU Interleukin-21 (IL-21, ImmunolTools, Friesoythe) stimuliert. Anschließend werden die voraktivierten Zellen unstimuliert oder unter folgenden Stimulierungsbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert: 0,03 µg/µl anti-Ig-Antikörper, 1 µg/ml CD40-Ligand-HA (CD40L mit einer angehangenen Hämagglutinin (HA)-Sequenz, welche von anti-HA-Antikörpern erkannt wird und

damit das Signal intensiviert) mit 5 ng/ml anti-HA-Antikörpern, 3  $\mu$ M CpG OND Typ B oder 100 ng/ml CD40L *insect cell ghosts* (zur Verfügung gestellt von Dr. Stuart Tangye). Anschließend wird ein Aliquot von ca.  $2,5 \times 10^4$  Zellen abgenommen und mit gekühltem 70% Ethanol bei 4°C für 30 Minuten fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS/0,5% BSA (4°C, 400 x g für 5 Minuten) werden 3  $\mu$ g/ $\mu$ l RNase A (Qiagen, Hilden) hinzugefügt, die Zellen in 200  $\mu$ l Propidiumiodid (PI)-Lösung (50  $\mu$ g/ml, Merck, Darmstadt) überführt und anschließend mittels Durchflusszytometer am BD FACS Canto analysiert.

Alternativ wird die Proliferationskapazität durch die Anfärbung mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE), einem sogenannten Mitotracker, überprüft. Dieser färbt Zellen gleichmäßig mit einer definierten Intensität, diese halbiert sich durch jede darauffolgende Zellteilung und macht diese durchflusszytometrisch zählbar. Die Lymphozyten werden hierfür in einer Lösung von 1  $\mu$ l CFSE (5 mM, BioLegend) und 500  $\mu$ l PBS aufgenommen, resuspendiert und für 10 min bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Zwei Waschschriffe folgen, einmal mit eiskaltem Medium, einmal mit erwärmten Medium (37°C). Anschließend werden die Zellen mit 100 IU humanem, rekombinanten IL-21 in Kombination mit folgenden Stimulanzen behandelt: 0,03  $\mu$ g/ $\mu$ l anti-Ig-Antikörper, 1  $\mu$ g/ml CD40L-HA mit 5 ng/ml anti-HA-Antikörpern, 3  $\mu$ M CpG OND Typ B, oder 100 ng/ml CD40L *insect cell ghosts*. Die Analyse erfolgt ebenfalls am Durchflusszytometer BD FACS Canto.

## 2.17. Analyse der Überlebensfähigkeit von B-Zellen *in vitro*

Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit von B-Zellen *in vitro* werden die gewünschten Populationen sortiert und in Kultur genommen. Zwischen  $2,5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  B-Zellen werden in 150 – 300  $\mu$ l RPMI/FCS/Pen/Strep bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Ansätze werden bei Bedarf mit verschiedenen Reagenzien stimuliert.

Zu definierten Zeitpunkten werden Aliquots mit ca.  $2,5 \times 10^4$  B-Zellen entnommen und die vitale Zellfraktion bestimmt. Dazu werden die Zellen sedimentiert und in 80  $\mu$ l Annexin V-Puffer resuspendiert. 5  $\mu$ l Annexin V (BD Bioscience) werden hinzugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Kurz vor der Messung wird 1  $\mu$ l PI hinzugemischt. Die Analysen erfolgen am BD FACS Canto mittels BD FACS Diva Software. Vitale Zellen werden als Annexin V- und PI-negativ, sterbende oder tote Zellen als Annexin V- und PI-positiv, gewertet.



## 2.18. pBLNK-Messung

Die Aktivierbarkeit durch den BCR von B-Zellen nach TD- und TI-simulierter Stimulierung wird durch den Grad der Phosphorylierung von BLNK (eng.: *B cell linker*) bestimmt. Hierzu werden B-Zell-Populationen aus Buffy Coats aufgereinigt und sortiert.  $2,5 \times 10^5$  B-Zellen in 150  $\mu$ l RPMI/FCS/PenStrep werden entweder unstimuliert oder stimuliert bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 Stunden inkubiert. Stimulierungsbedingungen sind 0,03  $\mu$ g/ $\mu$ l anti-Ig-Antikörper allein, 1  $\mu$ g/ml CD40L-HA mit 5 ng/ml anti-HA-Antikörper oder 3  $\mu$ M CpG OND Typ B. Im Anschluss werden die Zellen mit 0,03  $\mu$ g/ $\mu$ l anti-Ig-Antikörper für 1 Stunde behandelt. Für intrazelluläre Färbungen müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Die Zellen werden mit PBS/0,5% BSA gewaschen und mit Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) nach Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert. Die Zellen werden in 250  $\mu$ l Cytofix für 12 min bei RT fixiert. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei RT mit 1 ml PermWash gewaschen und zentrifugiert (350 x g für 7 min, RT). Die Zellen werden in 60  $\mu$ l PermWash intrazellulär mit Phosflow anti-BLNK-PE-Antikörpern (BD Bioscience) für 1 Stunde bei RT gefärbt. Nach einem Waschschrift werden die Proben durchflusszytometrisch (FACS Canto, BD Bioscience) analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Phänotypische Charakterisierung von humanen, reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB

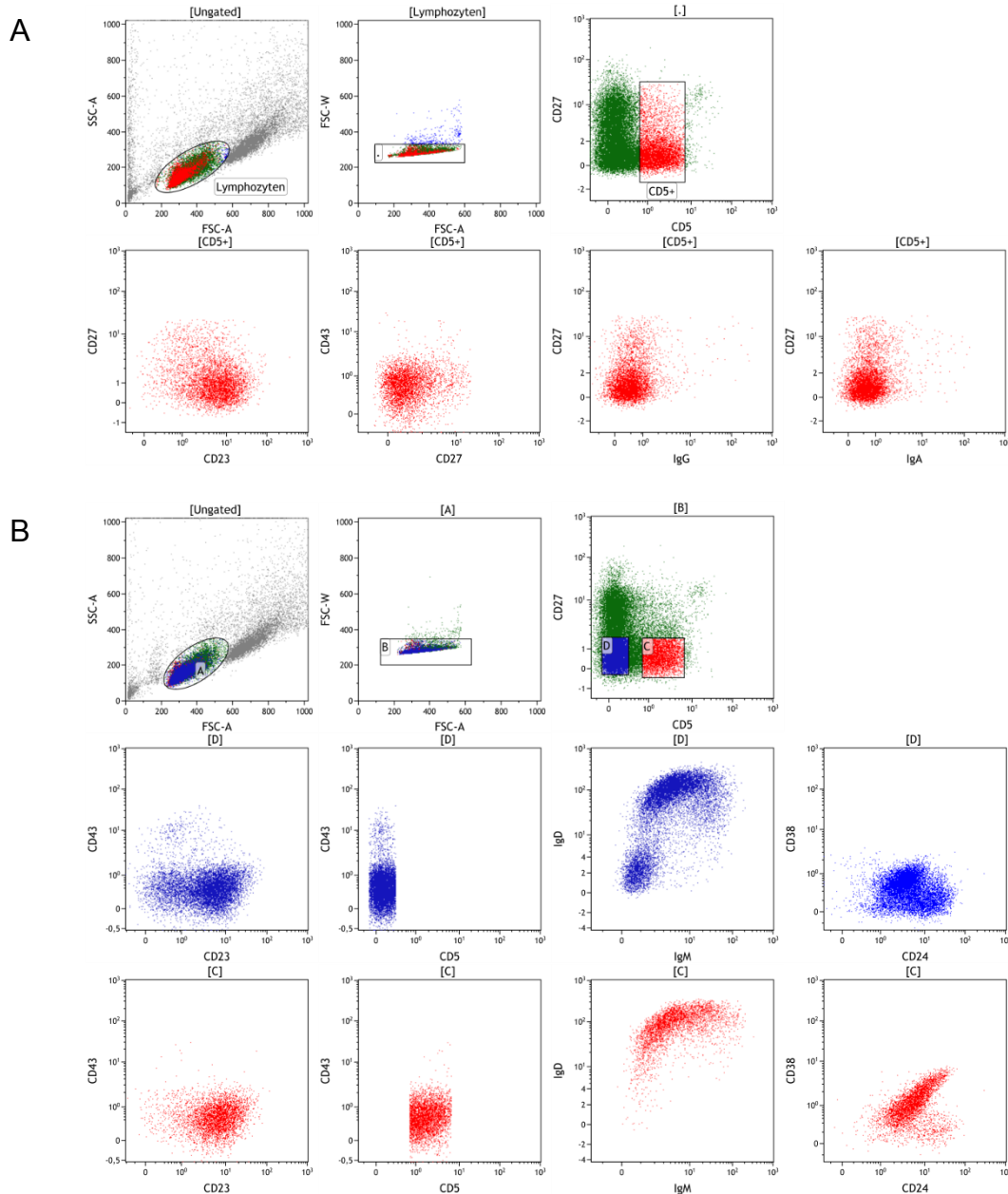
Im Fokus dieser Arbeit steht die Analyse humaner, reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen. Da bekannt ist, dass der CD5-Marker beim Menschen unter anderem auch auf unreifen B-Zellen ausgeprägt ist, wurden CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB phänotypisch charakterisiert und eine Markerkombination zur Isolierung von reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen festgelegt.

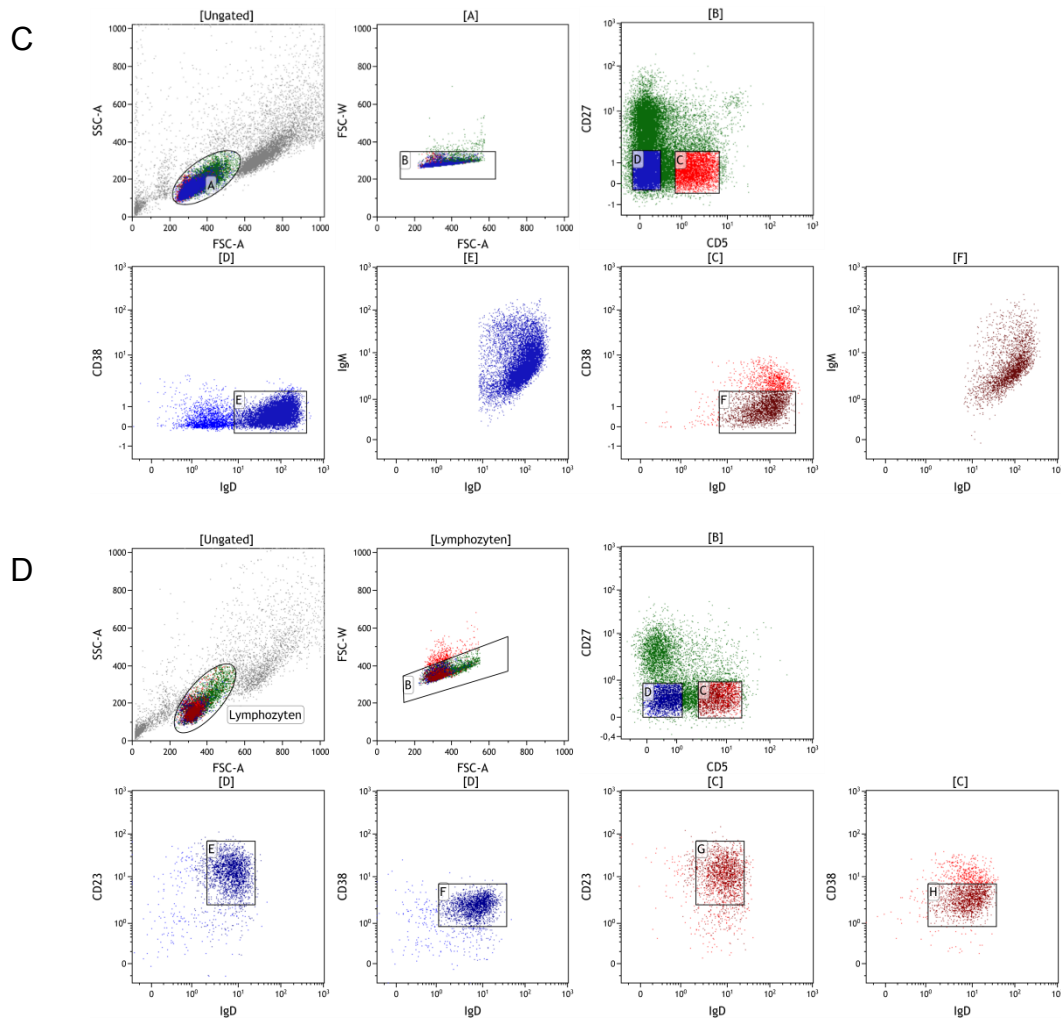
Betrachtet man die Gesamtheit der CD5<sup>+</sup> B-Zellen, lässt sich erkennen, dass der überwiegende Anteil CD23, ein Oberflächenmolekül typisch für Antigen-unerfahrene, naive B-Zellen, ausprägt. Ein anderer, geringerer Teil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen ist positiv für CD27, ein Marker, der hingegen auf Antigen-Erfahrung der Zelle hindeutet. Außerdem sind durchschnittlich >95% der CD5<sup>+</sup> B-Zellen IgM<sup>+</sup> und nur wenige weisen klassengewechselte BCR des Isotyps IgG oder IgA auf (Abb. 3A). IgE-Ausprägung wurde aufgrund der niedrigen Prävalenz von IgE<sup>+</sup> B-Zellen im PB nicht untersucht. In Studien zur Bestimmung einer humanen Population mit Eigenschaften von B-1a-Zellen wurden CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen vorgeschlagen. Daher wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Ausprägung von CD43 unter CD5<sup>+</sup> B-Zellen bestimmt. Es kann festgehalten werden, dass sehr wenige (<< 5%) der CD5<sup>+</sup> B-Zellen CD43 ausprägen.

Um eine möglichst homogene Population zu untersuchen wurden Antigen-erfahrene CD27<sup>+</sup> B-Zellen aufgrund ihres geringen Anteils unter CD5<sup>+</sup> B-Zellen ausgeschlossen (Abb. 3B). CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B-Zellen werden aufgrund ihrer Ähnlichkeiten (phänotypisch sowie in der Genausprägung (Seifert et al., 2012)), im Vergleich zu konventionellen naiven B-Zellen (CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) untersucht und dargestellt. CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B-Zellen sind positiv für CD23, IgD und IgM und prägen diese mit ähnlichen Ausprägestärken wie naive B-Zellen aus. CD43 wird nur von sehr wenigen CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B-Zellen ausgeprägt, tendenziell war dieser Marker vor allem auf CD27<sup>high</sup> Plasmablasten aufzufinden (nicht gezeigt). CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup> B-Zellen tragen damit in den weitergehenden Analysen nicht wesentlich zu den Ergebnissen bei, zudem ist der Hauptanteil der CD43<sup>+</sup> B-Zellen durch ihre Expression von CD27 von jeder Analyse ausgeschlossen. Der Anteil CD38<sup>high</sup>- und CD24<sup>high</sup>-ausprägender Zellen ist unter CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B-Zellen gegenüber naiven B-Zellen erhöht. Diese Markerkombination ist charakteristisch für transitionelle B-Zellen (Sims et al., 2005). Da der überwiegende

Teil der transitionellen B-Zellen ebenfalls CD5 ausdrückt (Sims et al., 2005), beinhalten  $CD5^+CD27^-$  B-Zellen einen nicht unerheblichen Anteil (ca. 50%) transitionelle B-Zellen. Daher wurden transitionelle B-Zellen anhand ihrer CD38-Ausprägung in einem weiteren Schritt ausgeschlossen (CD24-Expression als zusätzlicher Marker war redundant, nicht gezeigt); damit werden ausschließlich reife  $CD5^+CD27^-$  B-Zellen betrachtet (Abb. 3C).

Final wurde eine Markerkombination festgelegt, welche die hier zu analysierenden B-Zellen beschreibt und im Folgenden zur Isolierung durch Zellsortierung (wenn nicht anders benannt) genutzt wurde (Abb. 3D). Es ergibt sich folgende Definition für die im Weiteren als reife  $CD5^+$  B Zellen bezeichnete Population:  $CD5^+CD23^+CD27^-IgD^+CD38^{low}$ . Naive B-Zellen werden als  $CD5^-CD23^+CD27^-IgD^+CD38^{low}$  sortiert.

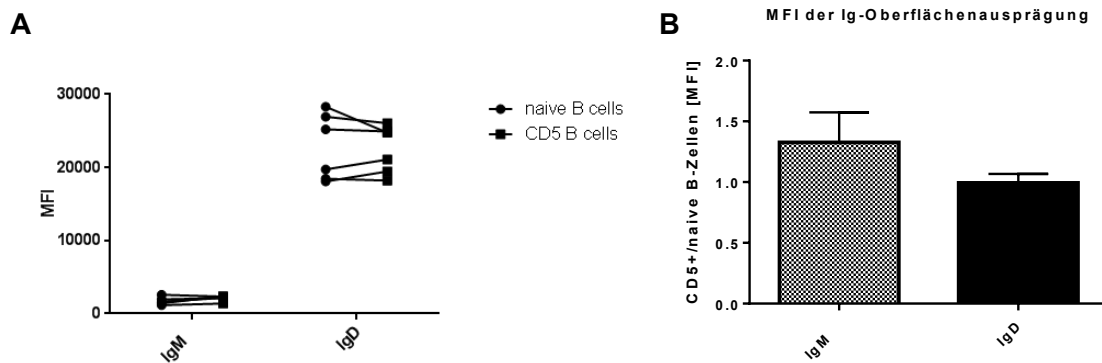




**Abbildung 3: Phänotypische Charakterisierung von humanen  $CD5^+$  B-Zellen aus PB**

Angereicherte PB B-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Ausprägung einiger ausgewählter Oberflächenmoleküle untersucht. Gezeigt sind die relativen Ausprägungslevel für (A) die Gesamtheit der  $CD5^+$  B-Zellen, (B)  $CD5^+CD27^-$  B-Zellen gegenüber naiven B-Zellen, (C)  $CD5^+CD27^-$  B-Zellen und naive B-Zellen unter Ausschluss von transitionellen ( $CD38^{high}$ ) B-Zellen sowie in (D) die Markerkombination und *Gating*-Strategie zur Isolierung von reifen  $CD5^+CD27^-$  B-Zellen. Konventionelle, naive B-Zellen lassen sich als  $CD5^-CD23^+CD27^-IgD^+CD38^{low}$  und  $CD5^+$  B-Zellen als  $CD5^+CD23^+CD27^-IgD^+CD38^{low}$  darstellen.

Das IgM- zu IgD-Verhältnis ist ein wichtiges Charakteristikum für humane IgM-ausprägende B-Zell-Populationen. Bei Untersuchungen der Oberflächenausprägungen von IgM und IgD konnten Unterschiede in der Intensität der Ausprägung von IgM festgestellt werden.  $CD5^+$  B-Zellen weisen im Mittel eine 1,5-fach höhere IgM-Ausprägung bei ähnlicher IgD-Ausprägung im Vergleich zu naiven B-Zellen auf (Abb. 4). In Kombination mit der  $CD5$ -Ausprägung ist dies eine erste interessante Parallele zu murinen B-1a-Zellen.



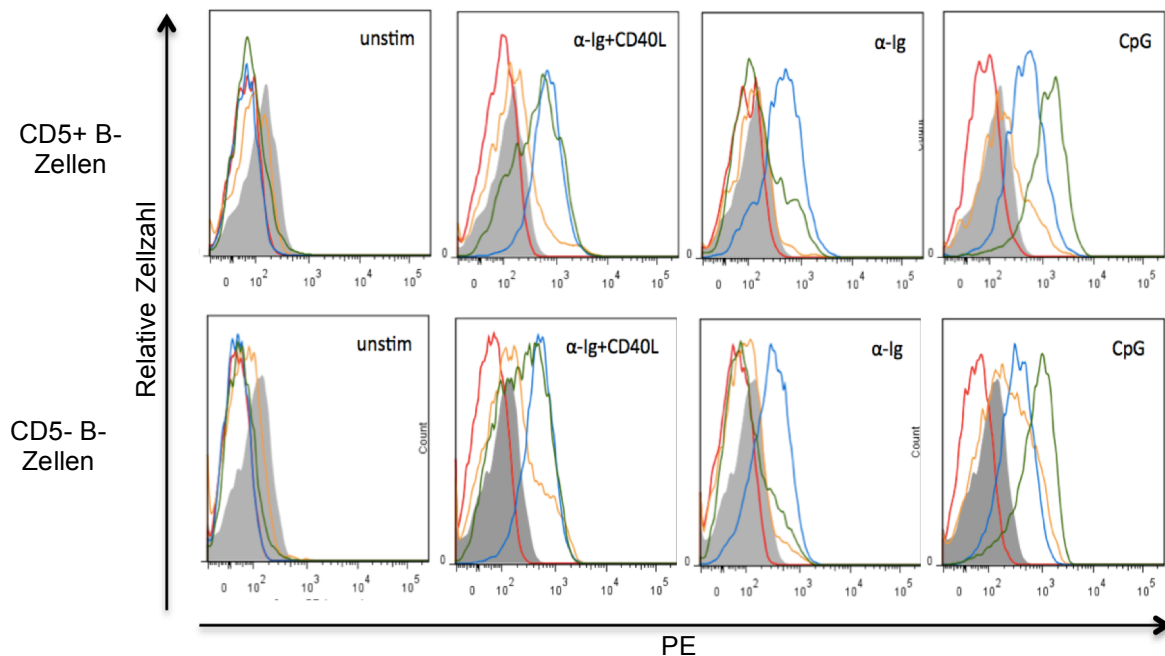
**Abbildung 4: CD5<sup>+</sup> B-Zellen prägen mehr Oberflächen-IgM aus als naive B-Zellen.**

CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen wurden aus PB isoliert und auf ihre mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für IgM und IgD untersucht. Gezeigt werden (A) die MFI für anti-IgM- und anti-IgD-Antikörper (n=6) und (B) der Quotient aus den MFI für anti-IgM- und anti-IgD-Antikörper von CD5<sup>+</sup> B-Zellen zu naiven B-Zellen, n=6, Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

### 3.2. Die reife CD5<sup>+</sup> B-Zell-Population enthält keine aktivierten B-Zellen

In früheren Publikationen (Werner-Favre et al., 1989) wurde beschrieben, dass B-Zellen nach *in vitro* Aktivierung CD5 ausdrücken können. Daher wurden reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB auf die Ausprägung typischer Aktivierungsmarker untersucht. Zum Vergleich dienen ruhende, nicht aktivierte, naive B-Zellen. Unstimulierte CD5<sup>+</sup> B-Zellen zeigen keine erhöhte Oberflächenausprägung von CD25, CD69 oder CD80 im Vergleich zu naiven B-Zellen und der Isotypkontrollfärbung (Negativkontrolle). Entsprechend handelt es sich um eine homogene, nicht aktivierte Population (Abb. 5).

Des Weiteren wurden CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen in Kultur genommen und eine TD- (anti-IgM-Antikörper und CD40L-HA + anti-HA-Antikörper), eine TI-2- (anti-IgM-Antikörper) und eine TI-1- (CpG) Aktivierung simuliert, um mögliche Unterschiede in der Stimulierbarkeit der Populationen zu untersuchen. Nach 6 Stunden Inkubation wurde die Ausprägung der Aktivierungsmarker bestimmt. Auch hier weisen CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu naiven B-Zellen unter allen Bedingungen ein annähernd identisches Ausprägungsmuster der genannten Aktivierungsmarker auf (Abb. 5). Eine Ausnahme ist der höhere Anteil an B-Zellen unter CD5<sup>+</sup> B-Zellen, der nach TI-1-simulierter Stimulierung, im Vergleich zu naiven B-Zellen, CD80 ausdrückt.



**Abbildung 5: Ausprägung von Aktivierungsmarkern auf reifen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen.**

Reife CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen aus PB wurden auf die Ausprägung von Aktivierungsmarkern und einem Plasmazellmarker hin untersucht. Die B-Zellen verblieben entweder unbehandelt oder wurden mit anti-IgM-Antikörpern und CD40L-HA + anti-HA-Antikörpern, anti-IgM-Antikörpern oder CpG für 6 Stunden stimuliert. Die B-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf folgende Oberflächenstrukturen untersucht: CD25 (grün), CD69 (blau), CD80 (gelb), CD138 (rot), Isotyp-Kontrolle (grau). n= 2

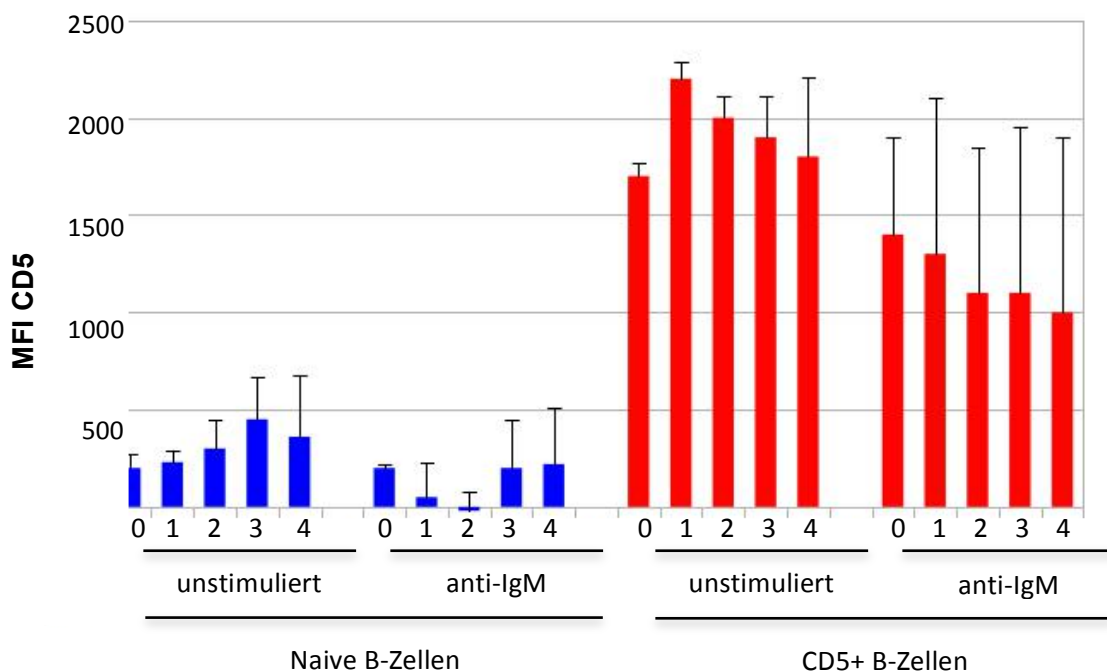
Im Hinblick auf weitere Untersuchungen ist es wichtig Plasmazellen von der Analyse ausschließen zu können, da diese besonderen Zellen sich in vielen Messverfahren (z.B. Ig-Sezernierung oder Genausprägungsmuster) als starke Fehlerquelle bemerkbar machen würden. Daher wurde die Ausprägung des Plasmazellmarkers CD138 ebenfalls bestimmt. Es konnte keine erhöhte Ausprägung von CD138 auf CD5<sup>+</sup> B-Zellen festgestellt werden. Entsprechend enthalten reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB keine Plasmazellen (Abb. 5).

### 3.3. CD5 ist auf reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen ein stabiler Oberflächenmarker

Eine zentrale Frage ist, ob reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen eine stabil CD5-ausprägende Population darstellen. Wie bereits in 3.2 beschrieben, wurde CD5 als Aktivierungsmarker auf B-Zellen vorgeschlagen, was auf CD5 als ein induzierbares

bzw. transient ausgeprägtes Molekül hinweisen würde. Daher wird hier die Stabilität der Oberflächenexpression bzw. die Induzierbarkeit dieses Moleküls auf CD5<sup>-</sup> naiven B-Zellen untersucht. Ließe sich ein Zugewinn oder Verlust von CD5 *in vitro* herbeiführen, könnte dies ein Hinweis auf eine heterogene CD5<sup>+</sup> B-Zell-Population sein.

CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen wurden aus PB isoliert und in Kultur genommen. Über einen Verlauf von 4 Tagen wurden täglich Zellen entnommen und auf die Intensität ihrer CD5-Ausprägung hin untersucht. Der Wert an Tag 0 dient dabei als Referenz für Hoch- oder Herunterregulation des Moleküls. Abbildung 6 zeigt, dass in unstimulierten Zellen weder naive noch reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen eine deutlich veränderte CD5-Ausprägung im Zeitverlauf aufweisen. Mit anti-IgM-Antikörpern stimulierte CD5<sup>+</sup> B-Zellen scheinen an CD5-Ausprägung abzunehmen, jedoch zeigen die einzelnen Experimente eine hohe Varianz und das Gesamtniveau der CD5-Ausprägung erreicht nicht das Niveau von naiven B-Zellen.



**Abbildung 6: Die CD5-Ausprägung auf reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen ist stabil.**

Die relativen Ausprägungsstärken von CD5 auf der Oberfläche von initial CD5<sup>-</sup> naiven und reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB wurden über 4 Tage gemessen. Die B-Zellen wurden entweder unstimuliert belassen oder mit anti-IgM-Antikörpern behandelt. Die Intensität der Ausprägung wird als mittlere Fluoreszenzintensität für anti-CD5-Antikörper angegeben. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler des Mittelwerts an. n=3 (unstimuliert); n=2 (anti-IgM)

Festzuhalten ist, dass weder in naiven B-Zellen eine gesteigerte CD5-Ausprägung, noch ein eindeutiger CD5-Verlust in CD5<sup>+</sup> B-Zellen hervorgerufen werden konnte. Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei PB CD5<sup>+</sup> B-Zellen um eine Population mit stabiler CD5-Ausprägung handelt.

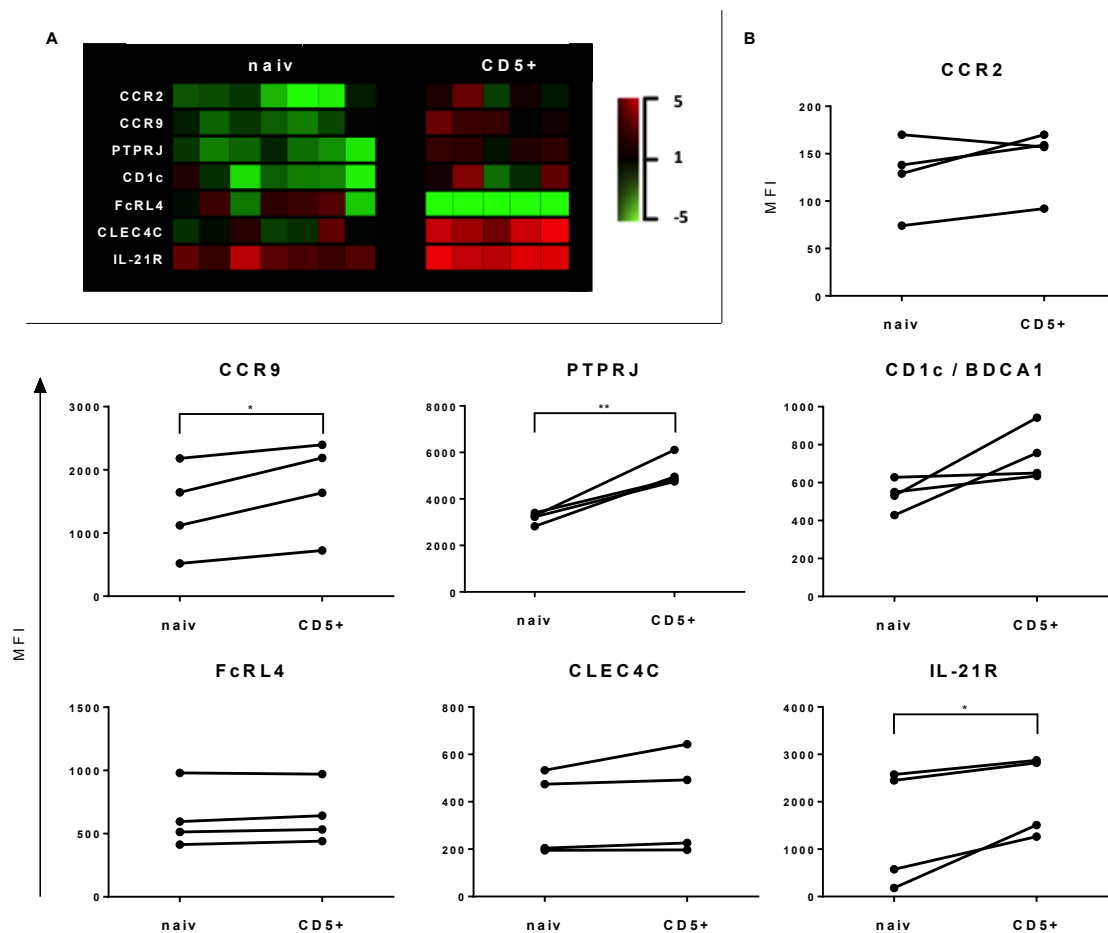
### 3.4. Differentiell exprimierte Oberflächenmoleküle zwischen naiven und reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen

Die bisherige phänotypische Analyse ergab – abgesehen von der CD5-Ausprägung und marginalen Unterschieden in der Oberflächen-Ig-Zusammensetzung - eine hohe Ähnlichkeit von reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen zu konventionellen naiven B-Zellen. Dies bestätigt vorherige Genausprägungsprofil-Analysen, bei denen simultan die Expressionslevel von bis zu 48.000 Transkripten mittels Transkriptom-Arrays für die Haupt-B-Zell-Populationen im Menschen bestimmt wurden (Seifert et al., 2012): auch in dieser Studie waren naive und reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen einander am ähnlichsten.

Um die womöglich feinen Unterschiede dieser beiden ruhenden B-Zell-Populationen vertiefend zu analysieren, wurden aus diesen publizierten Datensätzen gezielt alle Transkripte gefiltert, die unter 5% Irrtumswahrscheinlichkeit wenigstens 2-fach differentiell zwischen naiven und reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen ausgeprägt waren. Etwa 800 differentiell ausgeprägte Gene wurden ermittelt. Abbildung 7A zeigt eine *Heatmap*, die vergleichend die Ausprägung der beiden Populationen für sieben ausgewählte Gene zeigt, die eine potentiell unterschiedliche B-Zell-Funktion vermitteln könnten. *C-C Motive Chemokine Receptor 2* (CCR2) ist der Rezeptor für den Liganden *Monoocyte chemoattractant protein-1* (MCP1) und somit an der Interaktion mit Monozyten und wahrscheinlich an B-Zell-Migration beteiligt (Charo et al., 1994). *C-C Motive Chemokine Receptor 9* (CCR9) ist der Rezeptor für *Chemokine Ligand 25* (CCL25) und spielt unter anderem eine Rolle in der Rekrutierung von Lymphozyten in den Dünndarm (Pabst et al., 2004). *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type J* (PTPRJ) kodiert für den Rezeptor CD148, der vermutlich zur Regulation der Aktivierbarkeit einer Zellen durch den Antigenrezeptor beiträgt (Baker et al., 2001). CD1c ist ein Molekül, das Lipid- und Glycolipidantigene NKT-Zellen präsentieren kann (Fox et al., 2013; Kasmar et al., 2009). *FC receptor-like 4* (FcRL4) wurde als BCR-inhibierendes Oberflächenmolekül beschrieben (Sohn et al., 2011). *C-type lectin domain family 4 member C* (CLEC4C) hat einen regulatorischen Einfluss auf die Produktion von Interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) (Dzionek et al., 2001). Der Interleukin-21-



Rezeptor (IL-21R) erkennt IL-21 und unterstützt Proliferation und Differenzierung in B-Zellen (Zeng et al., 2007).



**Abbildung 7: Differenziell ausgeprägte Gene zwischen naiven und CD5<sup>+</sup> PB B-Zellen.**

(A) Aus vergleichenden Analysen von Genausprägungsdaten aus Microarray-Chips von naiven und CD5<sup>+</sup> PB B-Zellen wurden sieben differenziell exprimierte Gene ausgewählt, deren Funktionen von Relevanz für die immunologischen Funktionen der B-Zell-Populationen sein könnten. Naive B-Zellen (n=7) und CD5<sup>+</sup> B-Zellen (n=5). (B) Die selektierten Gene wurden auf ihre Proteinausprägung mittels Durchflusszytometrie untersucht (n=4). Die Signifikanzen wurden durch den gepaarten, einseitigen t-Test zwischen naiven und CD5<sup>+</sup> B-Zellen ermittelt (\* = p-Wert < 0,05; \*\* = p-Wert < 0,01).

Die vergleichenden Daten zeigen eine stärkere Ausprägung von CCR2, CCR9, PTPRJ, CD1c, CLEC4C und IL-21R in CD5<sup>+</sup> B-Zellen, während FcRL4 stärker in naiven B-Zellen ausgeprägt wird. Diese Ergebnisse sollten anschließend auf Proteinebene mittels FACS-Analysen validiert werden (Abb. 7B). Dabei konnte für CCR9, PTPRJ und IL-21R eine signifikant höhere, mittlere Fluoreszenzintensität für

CD5<sup>+</sup> B-Zellen bestätigt werden. Für CCR2, CD1c, FcRL4 und CLEC4C konnte kein signifikanter Unterschied in der Oberflächenausprägung zwischen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen festgestellt werden. Insgesamt kann festgehalten werden, dass reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen durchaus Moleküle ausprägen, die eine potentiell unterschiedliche Funktion zu naiven B-Zellen vermitteln können.

### **3.5. *In vitro* Studien zur T-Zell-abhängigen und –unabhängigen Stimulierbarkeit von reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen**

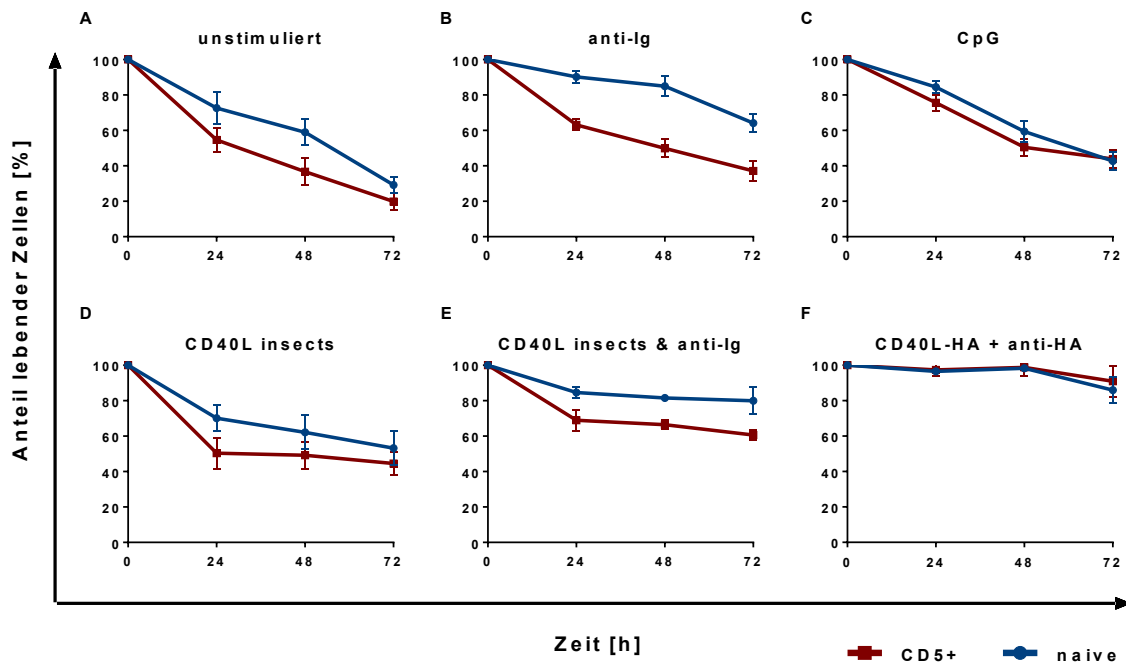
Um die immunologischen Funktionen von reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen verstehen zu können, ist es von Interesse, ob diese Lymphozyten präferenziell in TD- oder TI-Immunreaktionen reagieren. Dazu wurden *in vitro* Studien mit simulierten TD- oder TI-Stimulierungen durchgeführt und reife CD5<sup>+</sup> sowie naive B-Zellen auf ihre Überlebens- und Proliferationskapazität untersucht. Dabei wurden die Zellen entweder mit anti-IgM-Antikörpern und anti-CD40L-HA + anti-HA-Antikörpern (TD), CD40L-*insect cells* (TD), mit anti-IgM-Antikörpern (TI-2) oder mit CpG (TI-1) stimuliert. Ein Teil dieser Experimente wurde von Carola Barth (AG Küppers, Institut für Zellbiologie, Uniklinik Essen) im Rahmen ihrer Masterarbeit bearbeitet.

#### **3.5.1. Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen zeigen *in vitro* ein erhöhtes Überleben unter TI-1 Stimulierungsbedingungen**

Zunächst wurde das Überlebenspotential von reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen gegenüber naiven B-Zellen *in vitro* untersucht. Die B-Zell-Populationen wurden mittels MACS und Zellsortierung isoliert, in Kultur genommen und entweder unstimuliert belassen oder mit anti-IgM-Antikörpern, CpG, CD40L-*insect cells*, CD40L-*insect cells* + anti-IgM-Antikörpern, oder CD40L-HA + anti-HA-Antikörpern behandelt. Über einen Verlauf von 72 Stunden wurde täglich der Anteil lebender Zellen mittels Annexin V- und PI-Färbung bestimmt.

Unstimuliert zeigen CD5<sup>+</sup> B-Zellen gegenüber naiven B-Zellen einen geringeren Anteil lebender Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Unter allen Stimulierungsbedingungen konnte das Überleben beider Populationen erhöht werden, jedoch überlebten reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen unter allen Bedingungen schlechter als naive B-Zellen. CD40L-*insect cells* + anti-IgM-Antikörpern sowie CD40L-HA + anti-HA-Antikörpern ist die Stimulierung mit dem besten Überleben beider

Populationen. Auffällig ist, dass reife  $CD5^+$  B-Zellen unter CpG-Behandlung ein Überlebenspotential ähnlich der naiven B-Zellen zeigen (Abb. 8).

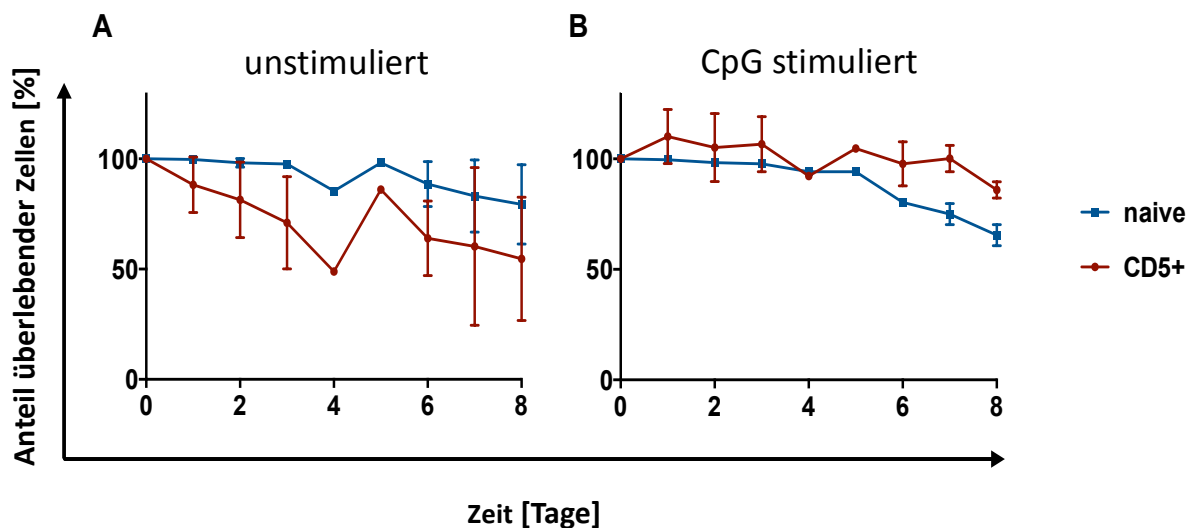


**Abbildung 8: B-Zellüberleben unter TI- und TD-Stimulierungsbedingungen *in vitro*.**

Naive und reife  $CD5^+$  PB B-Zellen wurden in Kultur genommen und nach 24 h, 48 h und 72 h der Anteil der lebenden Zellen bestimmt. Die B-Zell-Populationen wurden entweder (A) unstimuliert kultiviert oder zu Beginn mit (B) anti-IgM-Antikörpern, (C) CpG, (D) CD40L *insect cell ghosts*, (E) CD40L *insect cell ghosts* und anti-IgM-Antikörpern, oder mit (F) CD40L-HA und anti-HA-Antikörpern behandelt. Der Anteil lebender Zellen wurde durch PI- und Annexin V-Färbungen durchflusszytometrisch bestimmt. Der relative Anteil lebender Zellen wurde zum Zeitpunkt 0 auf 100% gesetzt und jeder weitere Messpunkt auf diesen normalisiert. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. n=4

Um den Effekt von CpG auf das Überleben von reifen  $CD5^+$  B-Zellen genauer zu untersuchen, wurden diese gemeinsam mit naiven B-Zellen als  $CD27^-$  B-Zellen durch MACS und Zellsortierung isoliert. Hier wurde berücksichtigt beide Populationen nach der B-Zellanreicherung nicht mit weiteren Antikörpern zu markieren, um einen möglichen Einfluss durch eine Bindung von CD5, IgD oder CD23 auszuschließen (*untouched*). Anschließend wurden beide Populationen unter unstimulierten und CpG-stimulierten Bedingungen inkubiert und das Überlebenspotential über acht Tage dokumentiert. Zusätzlich zur Annexin V- und PI-Färbung wurde CD5 gefärbt, um  $CD5^+$  B-Zellen getrennt von naiven B-Zellen untersuchen zu können. In diesem Ansatz wird der Effekt von CpG, also der TI-1-ähnlichen Stimulierung, deutlicher.

Während CD5<sup>+</sup> B-Zellen unstimuliert im Vergleich zu naiven B-Zellen weiterhin ein schlechteres Überleben aufweisen, zeigen sie unter CpG-Behandlung einen Überlebensvorteil (Abb. 9).



**Abbildung 9: Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen zeigen ein gesteigertes Überleben unter TI-1-ähnlicher Stimulierung.**

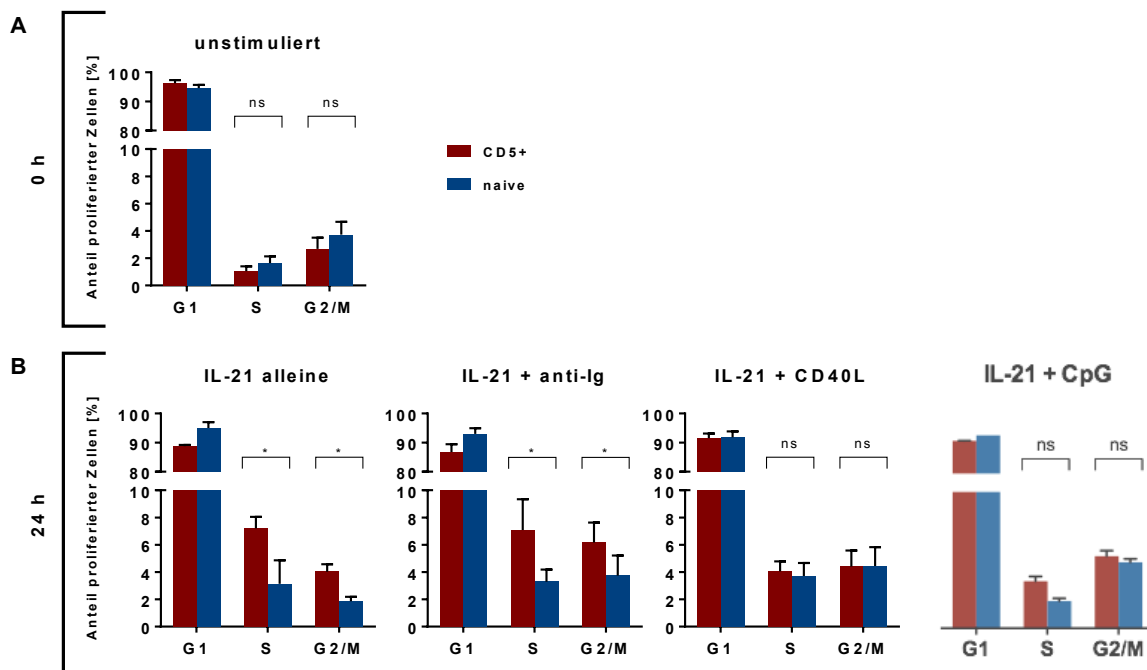
CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen wurden unter minimaler Markierung von Oberflächenantigenen isoliert. Die Mischkultur wurde entweder (A) unstimuliert belassen oder (B) mit CpG behandelt und über acht Tag auf ihr Überleben hin untersucht. CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen wurden mittels anti-CD5-Färbung unterschieden und die Vitalität der Zellen mit Annexin V- und PI-Färbung bestimmt. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. n=4

Somit zeigen CD5<sup>+</sup> B-Zellen ein vermindertes *in vitro* Überleben und eine Präferenz für eine Stimulierbarkeit durch TI-1-Antigene.

### 3.5.2. Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen zeigen *in vitro* ein verbessertes Proliferationsvermögen unter TI-Stimulierungsbedingungen

Eine effektive Stimulierung von B-Zellen kann zur Proliferation führen. Um die Proliferationskapazität von naiven und reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen zu vergleichen, wurden sie in Kultur mit anti-IgM-Antikörpern, CD40L-HA + anti-HA-Antikörpern oder CpG stimuliert. Außerdem wurde allen Konditionen IL-21 hinzugefügt. Der IL-21R war in den Genausprägungsdaten für reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu naiven B-Zellen deutlich erhöht, was zu der Hypothese führte, dass CD5<sup>+</sup> B-Zellen möglicherweise besser durch IL-21 stimuliert werden können. Nach 24 h in Kultur wurde eine mögliche Proliferation anhand des DNA-Gehaltes gemessen (Während der

Zellteilung wird das Genom in der S-Phase dupliziert und in der G2/M-Phase ist die Duplikation vollständig abgeschlossen, bevor sich die Zelle teilt). Schon die Behandlung mit IL-21 allein führt zu einer erhöhten Proliferation von CD5<sup>+</sup> B-Zellen. Dieser Effekt wird besonders durch BCR-Kreuzvernetzung (anti-IgM-Antikörper) verstärkt. Im Gegensatz dazu finden sich unter TD-ähnlichen Bedingungen (CD40L-HA + anti-HA-Antikörper) anteilig gleich viele reife CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen in S- oder G2/M-Phase (Abb. 10).

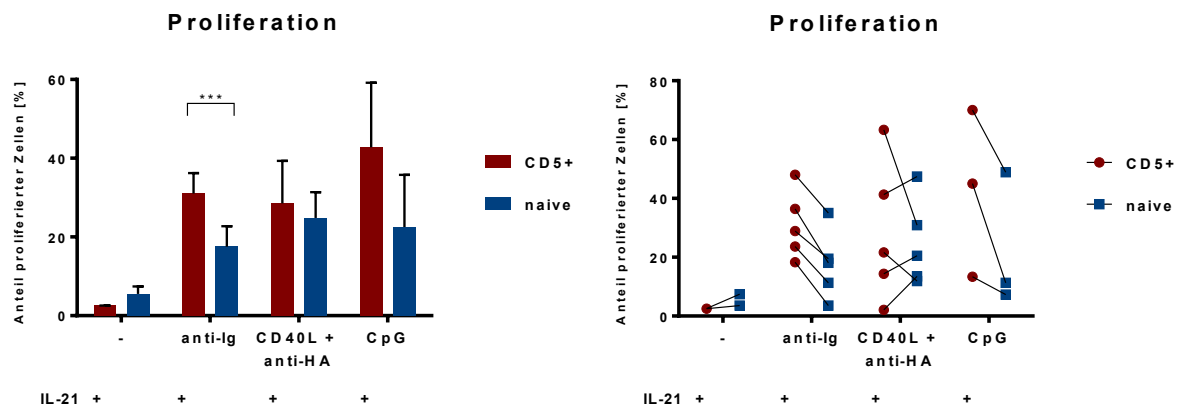


**Abbildung 10: Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen weisen eine gesteigerte Proliferation nach TI-2-Stimulierung auf.**

Die Proliferationskapazität von naiven und CD5<sup>+</sup> B-Zellen wird durch die Bestimmung des Anteils der Zellen, die sich in der S- oder G2/M-Phase des Zellzyklus befinden, ermittelt. Die B-Zellen werden unbehandelt belassen, mit IL-21 alleine oder mit IL-21 und anti-IgM-Antikörpern, CD40L-HA und anti-HA-Antikörpern oder CpG stimuliert. Anschließend werden die B-Zellen mit PI angefärbt und der relative Anteil der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase (A) zum Zeitpunkt 0 h und (B) nach 24 Stunden bestimmt. n=7, n<sub>IL-21 alleine</sub>=3, n<sub>CpG</sub>=2. Angegeben ist der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts. p-Werte wurden mit dem gepaarten, einseitigen t-Test ermittelt, \* = p-Wert < 0,05; ns = nicht signifikant.

In einem weiteren Experiment wurde Proliferation mittels eines sogenannten Mitotracker-Farbstoffes bestimmt. CFSE bindet kovalent intrazelluläre Moleküle, besonders Lysinreste. Bei einer Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und somit seine Intensität mit jeder Zellteilung halbiert.

Unstimuliert wiesen reife  $CD5^+$  B-Zellen ebenso wie naive B-Zellen annähernd keine Proliferation auf. Im Vergleich zu naiven B-Zellen konnte eine stärkere Proliferation unter  $CD5^+$  B-Zellen verzeichnet werden, wenn diese stimuliert wurden. Besonders unter BCR-Stimulierung konnte ein signifikant höherer Anteil an reifen  $CD5^+$  gegenüber naiven B-Zellen in der S- oder G2/M-Phase festgestellt werden (Abb. 11).



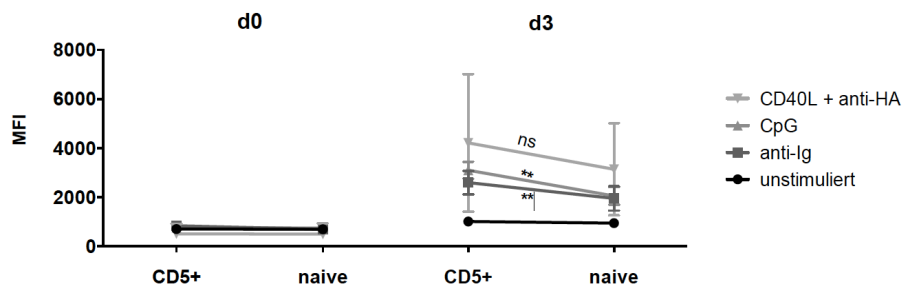
**Abbildung 11: Reife  $CD5^+$  B-Zellen zeigen unter TI-ähnlicher Stimulierung eine höhere Proliferationskapazität als naive B-Zellen.**

Die Proliferationskapazität von naiven und reifen  $CD5^+$  PB B-Zellen wurde durch Färbung mit CFSE bestimmt. Die Zellen wurden mit IL-21 behandelt und entweder unstimuliert belassen oder mit anti-IgM-Antikörpern, CD40L-HA und anti-HA oder CpG stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der Anteil der Zellen mit reduziertem CFSE-Signal, also der proliferierten Zellen, durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Balkendiagramm. (B) Darstellung gepaarter Datenpunkte. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. Der p-Wert wurde durch den gepaarten, einseitigen t-Test bestimmt. \*\*\* = p-Wert < 0,001; n ≥ 2.

Somit ergibt sich für reife  $CD5^+$  B-Zellen im Vergleich zu naiven B-Zellen eine höhere Proliferationskapazität unter IL-21 Stimulierung, besonders unter TI-2-ähnlichenr BCR-Kostimulation.

### 3.5.3. Präaktivierte $CD5^+$ B-Zellen weisen weniger pBLNK nach anti-IgM-Antikörper-Stimulierung auf

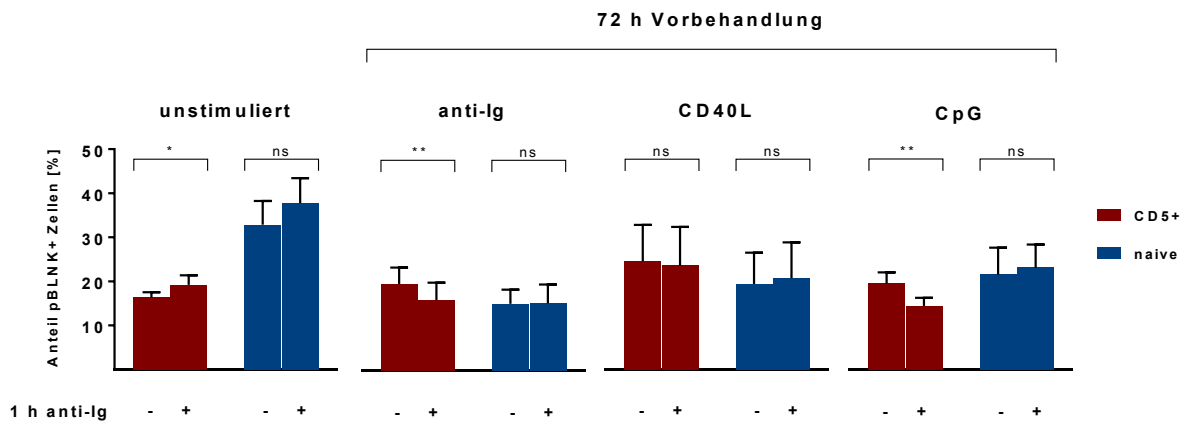
Aus den Genausprägungsprofilen geht hervor, dass FcRL4 in naiven B-Zellen transkribiert wird, in  $CD5^+$  B-Zellen jedoch nicht detektierbar ist. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass nach *in vitro* Stimulierung (TD sowie TI) reife  $CD5^+$  B-Zellen FcRL4 verstärkt hochregulieren. Diese Hochregulation ist unter naiven B-Zellen niedriger ausgeprägt (Abb. 12).



**Abbildung 12: Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen erhöhen nach Stimulierung die Ausprägung von FcR4L.**

Humane PB CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen wurden zusammen (CD27<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) isoliert und vor sowie nach Stimulierung für 3 Tage mit anti-IgM-Antikörpern, CD40L-HA + anti-HA-Antikörpern oder CpG auf ihre Oberflächenausprägung von FcR4L untersucht. Dargestellt sind die MFI für anti-FcR4L-Antikörper (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts), n=2. Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten, einseitigen t-Test zwischen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen bestimmt (\*\* p < 0,01; ns = nicht signifikant).

FcRL4 kann die intrazelluläre Weiterleitung von Antigen-induzierten BCR-Signalen blocken, indem die Phosphorylierung von SYK (engl.: *spleen tyrosine kinase*) und BLNK inhibiert wird (Sohn et al., 2011). Entsprechend lässt die erhöhte FcR4L-Ausprägung von aktivierten, reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen eine möglicherweise reduzierte Antwort auf BCR-Stimulierung vermuten. Daher wurde hier *in vitro* zunächst eine TD- oder TI-Stimulierung beider Populationen simuliert und anschließend die Aktivierbarkeit des BCR-Signalwegs durch eine weitere TD-Stimulierung mit anti-IgM-Antikörpern getestet. Bestimmt wird die Phosphorylierung von BLNK (pBLNK). Ohne vorherige Stimulierung reagieren reife CD5<sup>+</sup> sowie naive B-Zellen mit einem leichten Anstieg von pBLNK auf anti-IgM-Antikörper-Stimulierung. In naiven B-Zellen hat eine Vorbehandlung mit anti-IgM-Antikörpern, CD40L oder CpG keinen signifikanten Einfluss auf die anschließende Stimulierbarkeit mit anti-IgM-Antikörpern. pBLNK ist nicht signifikant erhöht oder reduziert. In CD5<sup>+</sup> B-Zellen hingegen konnte eine signifikant verminderte BCR-Aktivierbarkeit nach Vorbehandlung mit anti-IgM-Antikörpern (TI-2) sowie CpG (TI-1) festgestellt werden (Abb. 13).



**Abbildung 13: Eine reduzierte Anzahl an reifen CD5<sup>+</sup> PB B-Zellen zeigen pBLNK nach einer Stunde anti-IgM-Antikörper-Stimulierung, wenn sie TI-ähnlich prästimuliert wurden.**

Naive und CD5<sup>+</sup> B-Zellen wurden für 72 Stunden entweder unbehandelt belassen oder mit anti-IgM-Antikörpern, CD40L-HA und anti-HA-Antikörpern oder CpG prästimuliert. Anschließend wurde ein Teil jedes Ansatzes mit anti-IgM-Antikörpern und der anderer Teil unstimuliert für eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, mit anti-pBLNK-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die relativen Anteile von pBLNK-positiven Zellen unter allen B-Zellen mit Mittelwerten und Standardfehlern des Mittelwerts. p-Werte wurden mit dem gepaarten, einseitigen t-Test bestimmt, \* = p-Wert < 0,05, \*\* = p < 0.01, ns = nicht signifikant. n=4.

Zusammengenommen deuten die *in vitro* Experimente darauf hin, dass CD5<sup>+</sup> B-Zellen präferentiell auf TI-ähnliche Stimulierungsbedingungen reagieren, aber ebenso wie naive B-Zellen an TD-Immunreaktionen teilnehmen können. Dieser Befund korreliert mit der Oberflächenexpression von FCRL4, einem Molekül, das einen molekularen Schalter für den Wechsel von TD nach TI-Aktivierbarkeit darstellt (Sohn et al., 2011).

### 3.6. CD5<sup>+</sup> B-Zellen sezernieren IgM unter minimalen Stimulierungsbedingungen

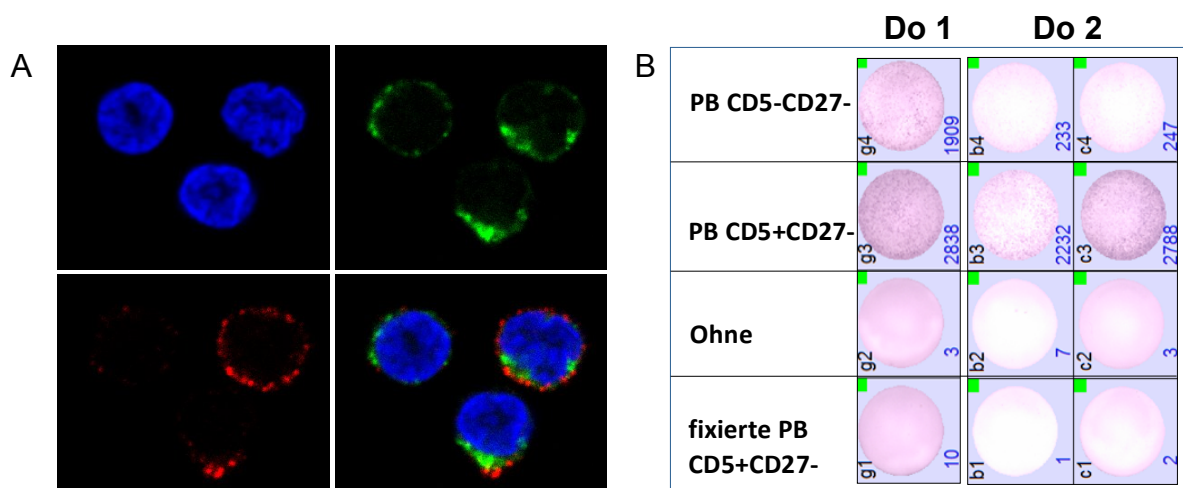
Eine der wichtigsten Eigenschaften von murinen B-1a-Zellen ist die spontane Sekretion von IgM. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses „natürliche IgM“ polyspezifisch ist, d.h. verschiedene Antigen- und Autoantigenspezifitäten gleichzeitig besitzt. Dies wird verstanden als eine unspezifische, dafür jedoch schnelle und vielseitige Immunabwehr gegen eine Vielfalt von Pathogenen (Hardy et al., 1994).



In der Literatur wird dieser Mechanismus als „spontane“, also nicht durch Aktivierung mit körperfremden Stoffen hervorgerufene Sekretion mit einem einhergehenden „natürlichen“ IgM-Titer beschrieben (Förster et al., 1987; Sidman et al., 1986). Es wird allerdings vermutet, dass auch murine B-1a Zellen ein gewisses Maß an Stimulierung, z.B. PRR-vermittelte Aktivierung, benötigen.

Spontane oder erleichterte IgM-Sezernierung sollte in ruhenden B-Lymphozyten anhand von IgM-enhaltenden Vesikeln erkennbar sein. Um potentielle Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von IgM zu erkennen, wurden reife CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen extrazellulär für CD5 gefärbt, fixiert und intrazellulär für IgM sowie Kernstrukturen gefärbt. Wie in dem Beispiel in Abbildung 14A zu sehen ist, können CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen anhand der CD5-Färbung unterschieden werden. Zunächst fiel auf, dass reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen höhere Mengen an intrazellulärem IgM aufwiesen. Zudem wiesen diese Lymphozyten häufig eine Kolokalisation von IgM und CD5 auf, die darüber hinaus auf einem Pol der jeweiligen Zelle auftrat (Abb. 14 A). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine besondere Aktivität der CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die sehr wahrscheinlich mit BCR-Signalempfang und einer Sekretion von IgM einhergeht. Diese IgM-polarisierten Zellen unterschieden sich von konventionellen Plasmablasten durch die Expression von CD5 und einen insgesamt kleineren und unauffälligeren Phänotyp.

Zur Feststellung, ob CD5<sup>+</sup> B-Zellen spontan (oder sehr schnell und effizient) IgM sezernieren, wurden ELISpot-Assays durchgeführt. CD5<sup>+</sup> B-Zellen, und naive B-Zellen, wurden isoliert und auf Membranen gegeben, die mit anti-IgM-„capture“-Antikörpern versehen waren. Nach Inkubation für 16 Stunden (ohne Zugabe von Stimulantien) wurden die Zellen abgewaschen und Spots von sezerniertem IgM mit einem Zweitantikörper, der ausschließlich pentameres IgM erkennt, detektiert. Die ELISpot-Assays ergaben, dass in acht von neun Spendern bis zu 10-mal mehr CD5<sup>+</sup> als naive B-Zellen IgM sezernierten. Ein einzelner Spender zeigte ca. 1,2 mal mehr Spots unter naiven B-Zellen. Abbildung 14B zeigt exemplarisch die ausgelesenen Spots für zwei Spender.



**Abbildung 14: Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen sezernieren schnell und effizient IgM.**

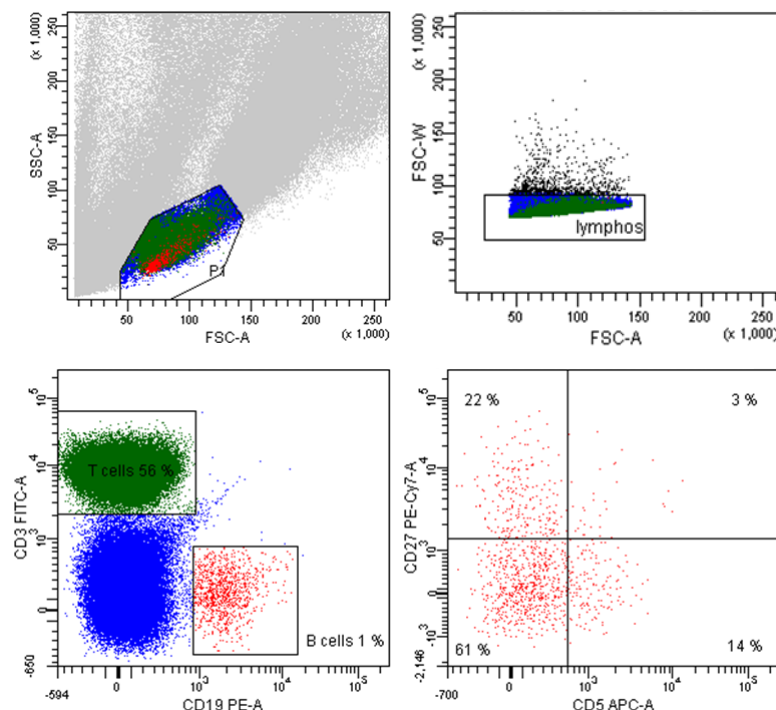
CD5<sup>+</sup> B-Zellen und naive B-Zellen wurden isoliert und ihre Kapazität IgM intrazellulär akkumulieren und sezernieren zu können untersucht. (A) Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von B-Zellen. Dargestellt ist der Zellkern (blau), Oberflächen-CD5 (rot) und intrazelluläres IgM (grün). (B) ELISpot-Assay. 10.000 B-Zellen einer Population wurden auf die anti-IgM-Antikörper-beschichtete Membrane gegeben. Nach 16 h Inkubation wurde sezerniertes IgM detektiert. Exemplarisch sind ausgezählte Spots für zwei Spender (Do 1 und Do 2) dargestellt. Für Do 2 werden Spots für zwei Entwicklungszeiten gezeigt. n=9

### 3.7. Peritoneale Lokalisation

In Mäusen sind B-2-Zellen die dominante Population in der Milz und im PB und kommen kaum in der Bauchhöhle vor, wohingegen B-1a-Zellen vornehmlich in der Bauchhöhle, weniger in der Milz und kaum im PB der Maus vorzufinden sind (Kroese et al., 1992). Publikationen beschreiben, dass keine oder nur sehr wenige B-Zellen in der humanen Bauchhöhle zu finden sind (Nisitani et al., 1997), und diese nur unzureichend charakterisiert sind. Daher wurden in dieser Arbeit in Kooperation mit der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Essen (Prof. Kimmig, Dr. Rusch, Dr. Kern) Peritoneallavagen, also Spülungen von Bauchhöhlen, an immunologisch unauffälligen Patientinnen (Fertilitätstestungen, Verdacht auf Zystenbildung) durchgeführt und enthaltene B-Zell-Populationen charakterisiert. Insgesamt wurden 21 Lavagen ausgewertet und der enthaltene B-Zell-Anteil, besonders CD5<sup>+</sup> B-Zellen bestimmt. Aus 6 Lavagen wurde zusätzlich der relative Anteil CD27<sup>+</sup> B-Zellen bzw. aus 2 Lavagen der relative Anteil CD43<sup>+</sup> B-Zellen bestimmt. In allen Proben waren B-Zellen auffindbar. Der Anteil und die Zusammensetzung der untersuchten Populationen unterschied sich deutlich von PB, war jedoch sehr heterogen z.B. lag der Anteil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen unter allen B-Zellen

im Mittel bei 14,2% und schwankte zwischen 0% und 39,4% (Abb. 15). Zum Vergleich: Der Anteil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Blut liegt bei gleichaltrigen Spendern unter 10%. Daher ist der Anteil an reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der menschlichen Bauchhöhle oftmals höher. Die absolute Anzahl der B-Zellen im Peritoneum konnte nicht sicher bestimmt werden, da eine exakte Zellzahlbestimmung aufgrund des hohen Anteils von Zellfragmenten, Fibroblasten usw. nicht eindeutig möglich war. Wir schätzen, dass die Gesamtanzahl von B-Zellen in gesunden, d.h. immunologisch unauffälligen, Bauchhöhlen unter der PB-B-Zell-Zahl liegt.

Die Ausprägung von CD27 auf B-Zellen war ebenfalls sehr heterogen, im Mittel 16% bei einer Spanne von 0% - 47,3%. Nur ein äußerst geringer Anteil der peritonealen B-Zellen prägt CD43 aus (2,1% und 1,5%).



**Abbildung 15: In humanen Bauchhöhlen befinden sich CD5<sup>+</sup> B-Zellen.**

Aus Peritoneallavagen von immunologisch unauffälligen Spenderinnen wurden mononukleäre Zellen isoliert und für die Ausprägung ausgewählter Oberflächenstrukturen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt ist ein Beispiel für die Verteilung der Lymphozyten-Populationen. Lymphozyten werden eingegrenzt, Dubletten ausgeschlossen und für CD3- und CD19-Ausprägung dargestellt. B-Zellen werden zusätzlich für CD5- und CD27-Ausprägung analysiert.

### **3.7.1. IGHV-Gen-Nutzung und Klonalitätsanalyse von reifen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen der menschlichen Bauchhöhle**

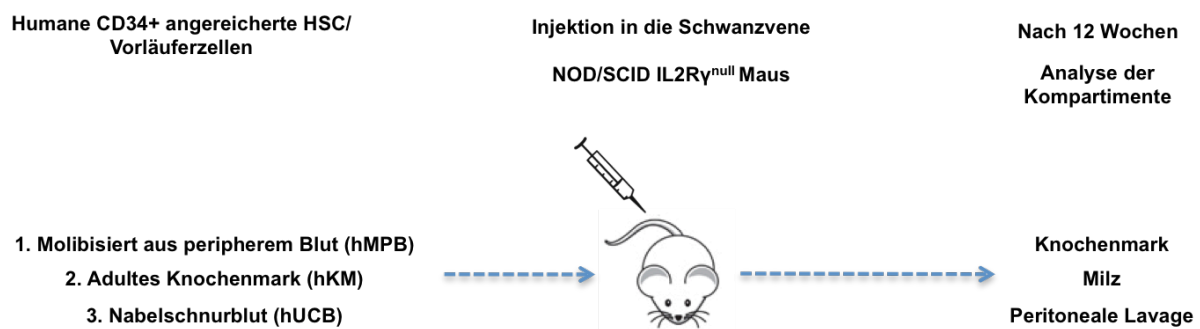
Von vier Peritoneallavagen wurden bis zu 1000 CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen isoliert und mittels PCR und Klonierung auf die IGHV-Nutzung und Klonalität untersucht. Insgesamt wurden für CD5<sup>+</sup> B-Zellen 150 Sequenzen (Spanne je Spender 20-50) und für naive B-Zellen 120 Sequenzen (Spanne je Spender 15 – 45) ausgewertet. Die analysierten Sequenzen waren weitgehend unmutiert, die Nutzung der untersuchten IGHV-Segmente wies im Vergleich der beiden Populationen keine signifikanten Unterschiede auf. Innerhalb der jeweiligen Populationen konnten identische Sequenzen festgestellt werden, da die geringe Anzahl der gewonnenen Lymphozyten jedoch keine Analyse in biologischen Replikaten ermöglichte, konnten solche möglichen klonalen Expansionen nicht gesichert werden. Zwischen den untersuchten Populationen konnten keine klonal verwandten Sequenzen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.8. Humanisierung von NSG-Mäusen mit humanen CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen**

B-1a-Zellen bilden in Mausmodellen neben B-2- und Marginalzonen-B-Zellen eine separate, ontogenetisch frühe B-Zell-Linie mit distinkten, immunologischen Funktionen. Transferstudien haben gezeigt, dass B-1a-Zellen vermutlich früher auftretenden HSC/Vorläuferzellen entstammen als B-2-Zellen. Wurden HSC/Vorläuferzellen aus dem Knochenmark einer adulten Maus entnommen und in ein Lymphozytendefizientes Tier injiziert, so wurde die Maus mit B-2-Zellen rekonstituiert. Wurden wiederum HSC/Vorläuferzellen aus dem Dottersack eines Embryos entnommen und transferiert, so wurden ausschließlich B-1a-Zellen generiert (Hardy et al., 1994; Kantor et al., 1993). Dies weist auf eine unterschiedliche Kapazität von „juvenilen“ und „adulten“ HSC/Vorläuferzellen hin, B-1a-Zellen generieren zu können.

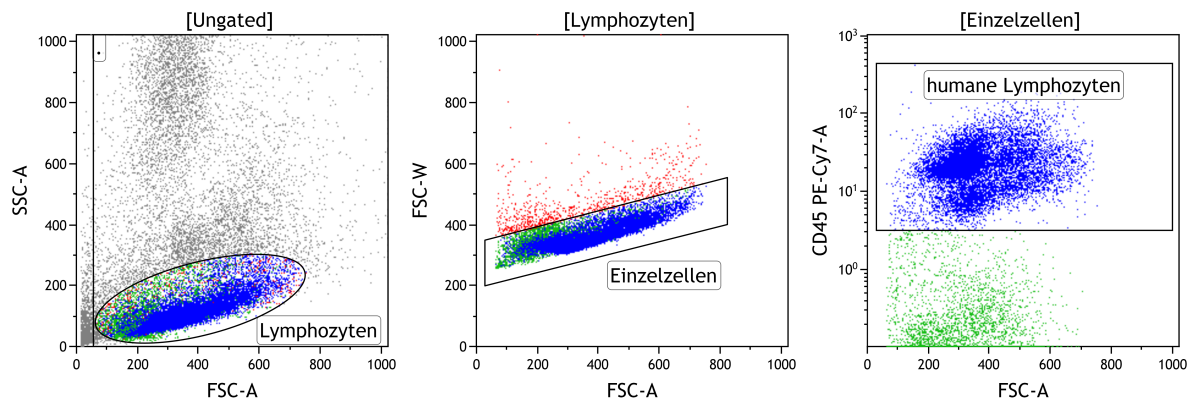
Analog zu diesem Ansatz wurden in dieser Arbeit humane HSC/Vorläuferzellen aus verschieden alten Spendern in NSG-Mäuse transferiert und die B-Zell-Zusammensetzung der Milz, des Knochenmarks und des Peritoneums nach zwölf Wochen untersucht. NSG-Mäuse besitzen keine eigenen B- und T-Zellen sowie stark verminderte Zahlen von NK-Zellen und dendritischen Zellen und können effizient mit humanen Zellen rekonstituiert werden. Adulte HSC/Vorläuferzellen wurden von

gesunden, erwachsenen Spendern aus Knochenmark (engl.: *bone marrow*, BM) oder aus Apheresaten (engl. *mobilized from peripheral blood*, mPB) gewonnen. „Juvenile“ HSC/Vorläuferzellen wurden aus Nabelschnurblut (engl.: *umbilical cord blood*, UCB) isoliert. HSC/Vorläuferzellen wurden als CD34<sup>+</sup> Zellen selektiert und die Zellzusammensetzung des Spendermaterials mittels typischer Oberflächenmarker kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Zwölf Wochen nach der Injektion von  $1,5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  HSC/Vorläuferzellen wurden eine Peritoneallavage durchgeführt und die Milz sowie das Knochenmark entnommen (Ablauf ist in Abbildung 16 gezeigt, eine Übersicht der Proben befindet sich im Anhang Tabelle S1).



**Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Kapazität von humanen HSC/Vorläuferzellen B-Lymphozyten-Populationen zu generieren.**

Da die Effizienz der Transplantation gegebenenfalls ausschlaggebend für die Entwicklung der B-Zell-Populationen sein kann, wurde für jede Maus die Transplantationseffizienz bestimmt. Maß dafür war der Anteil CD45-ausprägender humaner Zellen unter der Gesamtzellzahl der Knochenmarksbiopsate. Ein Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Beispiel zur Bestimmung der Transplantationseffizienz humaner Zellen in NSG-Mäusen nach Transfer von humanen HSC/Vorläuferzellen.**

Zur Bewertung, wie gut die transferierten humanen HSC/Vorläuferzellen in der Maus angewachsen sind, wurde der Anteil humaner Zellen im murinen Knochenmark bestimmt. Exemplarisch wird die *Gating*-Strategie an einem Beispiel dargestellt. Diese Maus hatte CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen aus hUCB erhalten.

Es zeigte sich eine geringe Effizienz für das Anwachsen der HSC/Vorläuferzellen aus peripherem Blut (Mittelwert 0,40%) sowie aus Knochenmark (1,81%). HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut rekonstituierten besser, mit im Mittel 16,65% CD45<sup>+</sup> Zellen, jedoch mit hoher Varianz (Tabelle 1, Abb. 18).

Um zu testen, ob eine bestimmte Vorläuferpopulation unter den CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut hauptsächlich für das effiziente Anwachsen und die Genese von B-Zell-Populationen verantwortlich ist, wurden aus CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen drei bestimmte Vorläuferpopulationen isoliert und NSG-Mäusen injiziert. Die Multipotenten Vorläufer (engl.: *multipotent progenitors*, MPP) wurden als CD45RA<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>, die Lymphoiden Multipotenten Vorläufer (engl.: *lymphoid-primed multipotent progenitors*, LMPP) als CD45RA<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> und die Erythromyeloiden Vorläufer (engl.: *erythromyeloid progenitor*, EMP) als CD45RA<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> angereichert (Görgens et al., 2013). Die Transplantationseffizienz für MPPs war am höchsten mit einem Mittelwert von 61,17%, gefolgt von den LMPPs mit 18,65%. EMPs zeigten die schlechteste Effizienz mit 2,07% (Tabelle 1, Abb. 18). Das zeigt, dass in den humanisierten Mäusen frühe menschliche Vorläuferzellen die höhere Rekonstituierungseffizienz ermöglichen.

**Transplantationseffizienz  
humaner Zellen in NSG-Maus**

Humane Zellen im mKM [%]

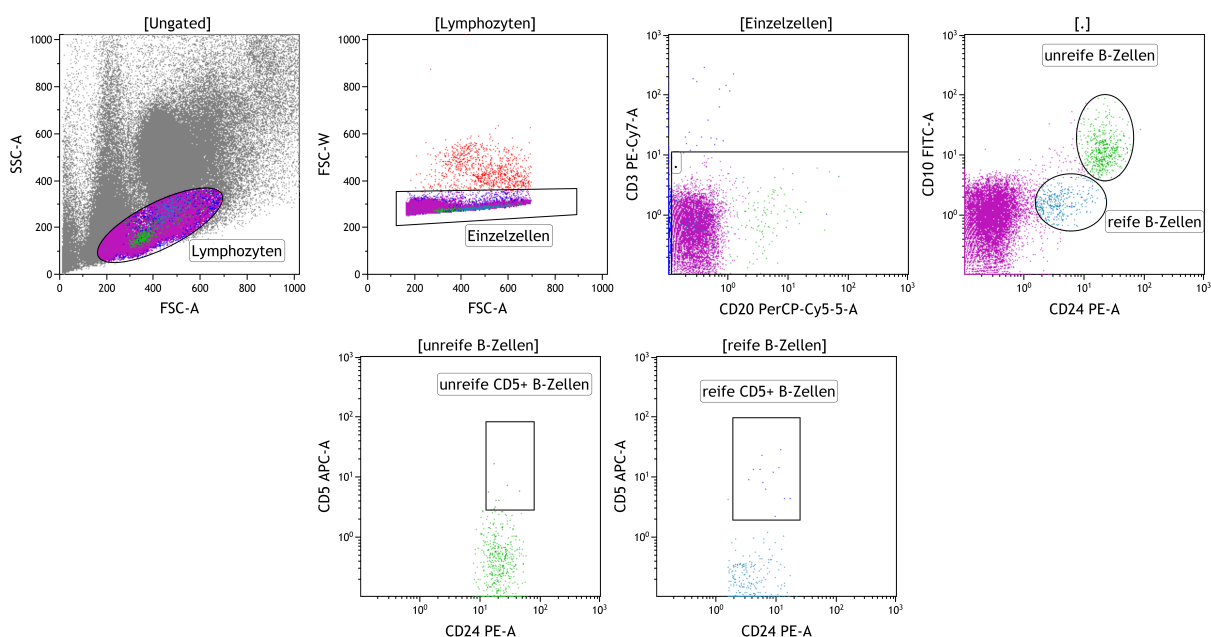
mHPB CD34+ hKM CD34+ hUCB CD34+ hUCB MPP hUCB LMPP hUCB EMP

Group	Humane Zellen im mKM [%]
mHPB CD34+	0
hKM CD34+	0, 8
hUCB CD34+	0, 3, 13, 22, 44, 55, 60
hUCB MPP	35, 67, 69, 74
hUCB LMPP	0, 2, 68
hUCB EMP	0, 4

Die aus Nabelschurblut (hUCB), peripherem Blut (hmPB) oder Knochenmark (hKM) isolierten humanen CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen wurden in NSG-Mäuse transferiert. Nach 12 Wochen wurde im Knochenmark der Mäuse der Anteil humaner Zellen (CD45<sup>+</sup>) festgestellt. Des Weiteren wurden Subpopulationen aus Nabelschnurblut transplantiert. MPP: Multipotente Vorläufer; LMPP: Lymphoide Multipotente Vorläufer; EMP: Erythromyeloide Vorläufer; n=4-16 (siehe Tabelle 1)

### 3.8.1. Ausschließlich HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut konnten eine reife CD5<sup>+</sup> B-Zell-Population im Peritoneum der Maus generieren

Neben der Transplantationseffizienz wurde die Zusammensetzung der B-Zell-Populationen innerhalb des Knochenmarks, der Milz und der Bauchhöhle der Mäuse charakterisiert. Dazu wurden mononukleäre Zellen isoliert, für CD20, CD3, CD10, CD24 und CD5 markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die vollständige *Gating*-Strategie wird anhand eines Beispiels, hier das Knochenmark einer Maus, die HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut erhalten hat, in Abbildung 19 gezeigt.



**Abbildung 19: *Gating*-Strategie zur Bestimmung von B-Zell-Populationen in rekonstituierten NSG-Mäusen.**

Zunächst werden Lymphozyten eingegrenzt, Dubletten ausgeschlossen, CD3<sup>+</sup> T-Zellen ausgeschlossen und anschließend CD20<sup>+</sup>/low B-Zellen für reife (CD24<sup>low</sup>CD10<sup>low</sup>) und unreife B-Zellen (CD24<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) unterschieden. Beide B-Zell-Populationen werden für ihre CD5-Ausprägung dargestellt.

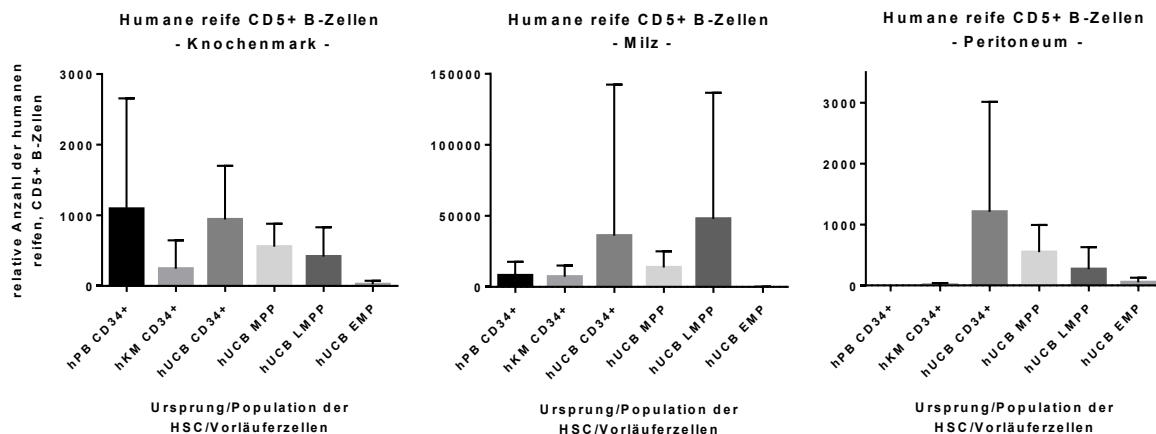
Unter den humanen Zellen befanden sich hauptsächlich Lymphozyten, wovon B-Zellen den mit Abstand größten Anteil ausmachten und nur wenige T-Zellen festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden werden repräsentative Beispiele für die Verteilung der B-Zellen aus jeweils dem Knochenmark, der Milz und der Bauchhöhle einer Maus gezeigt, die entweder HSC/Vorläuferzellen aus PB, Knochenmark oder Nabelschnurblut erhalten hat (Abb. 21 und Abb. 22). Aus diesen drei Transplantationsmethoden wird



ersichtlich, dass sich im Knochenmark der Maus anteilig deutlich mehr unreife ( $CD20^{low}CD24^{hi}CD10^{hi}$ ) als reife B-Zellen ( $CD20^{+}CD24^{low}CD10^{low}$ ) befinden, während der Anteil der reifen B-Zellen in der Milz überwiegt. Des Weiteren scheinen lediglich reife B-Zellen CD5 auszuprägen.

Es ist wichtig festzuhalten, dass ausschließlich Mäuse, die HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut erhalten haben, eine reife  $CD5^{+}$  B-Zell-Population im Peritoneum aufweisen. Diese Population im Peritoneum konnte nicht in Mäusen nachgewiesen werden, deren HSC/Vorläuferzellen aus PB oder Knochenmark entstammten (Abb. 20). Dies ist von besonderem Interesse, da diese spezielle, reife  $CD5^{+}$  B-Zell-Population den B-1a-Zellen, welche vornehmlich im Peritoneum der Maus lokalisiert ist, phänotypisch stark ähnelt.

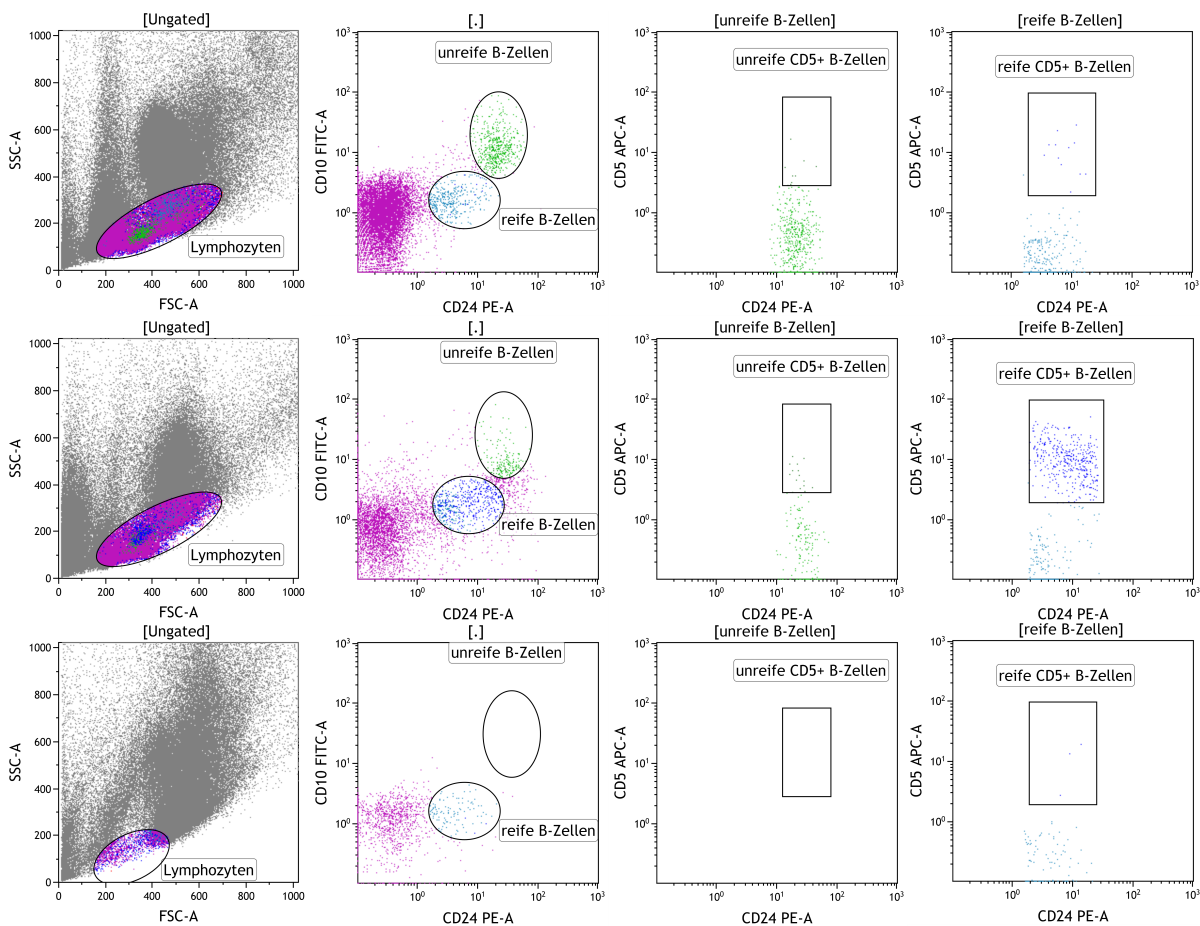


**Abbildung 20: Reife  $CD5^{+}$  B-Zellen im Peritoneum der Maus werden ausschließlich durch HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut generiert.**

NSG-Mäuse erhielten humane  $CD34^{+}$  HSC/Vorläuferzellen aus Apheresaten oder Knochenmark adulter Spender oder aus Nabelschnurblut. Nach 12 Wochen werden B-Zell-Populationen im Knochenmark, in der Milz und im Peritoneum der Maus bestimmt. Gezeigt ist die relative Anzahl reifer  $CD5^{+}$  B-Zellen in Abhängigkeit vom Ursprung der HSC/Vorläuferzellen und der Subpopulation. hPB n=4, hKM n=11, hUCB n=17, hUCB MPP n=4, hUCB LMPP n=4, hUCB EMP n=5

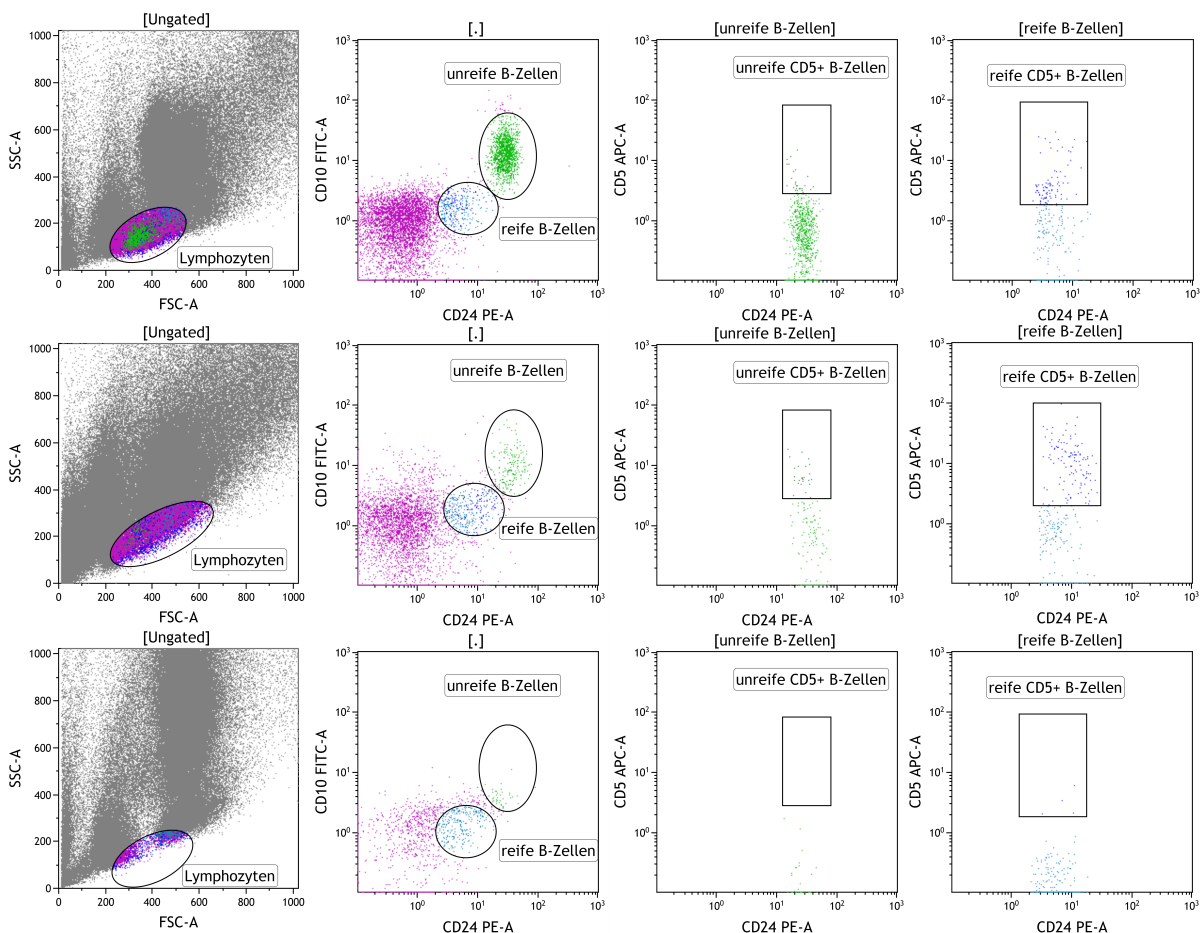
**A**

**mKM**

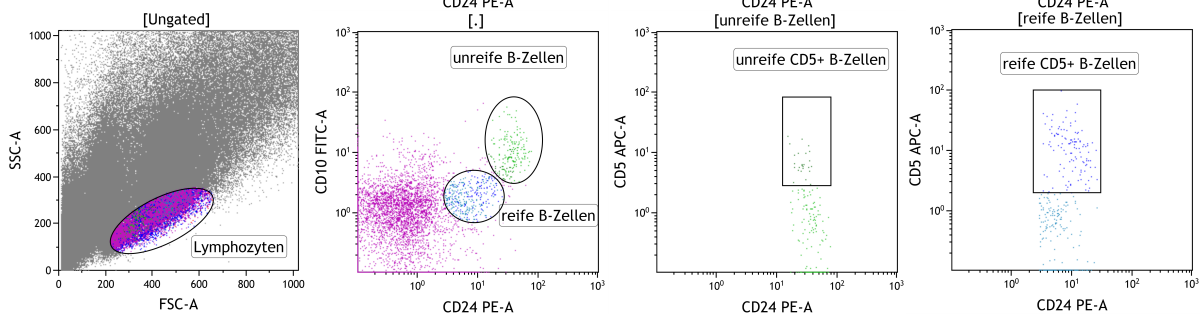


**B**

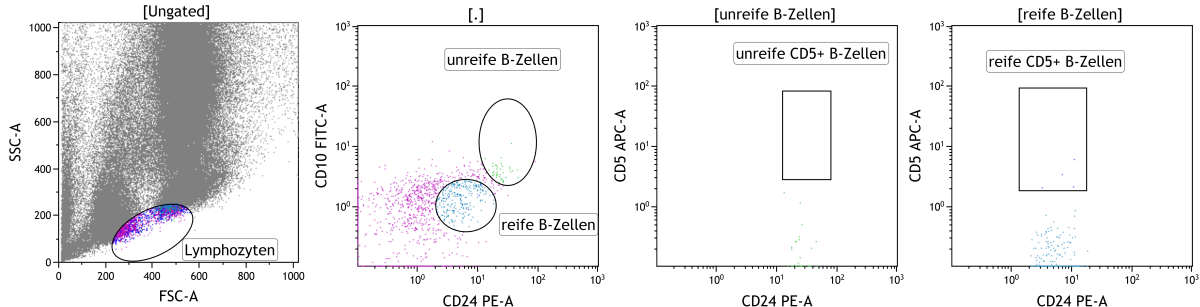
**mKM**

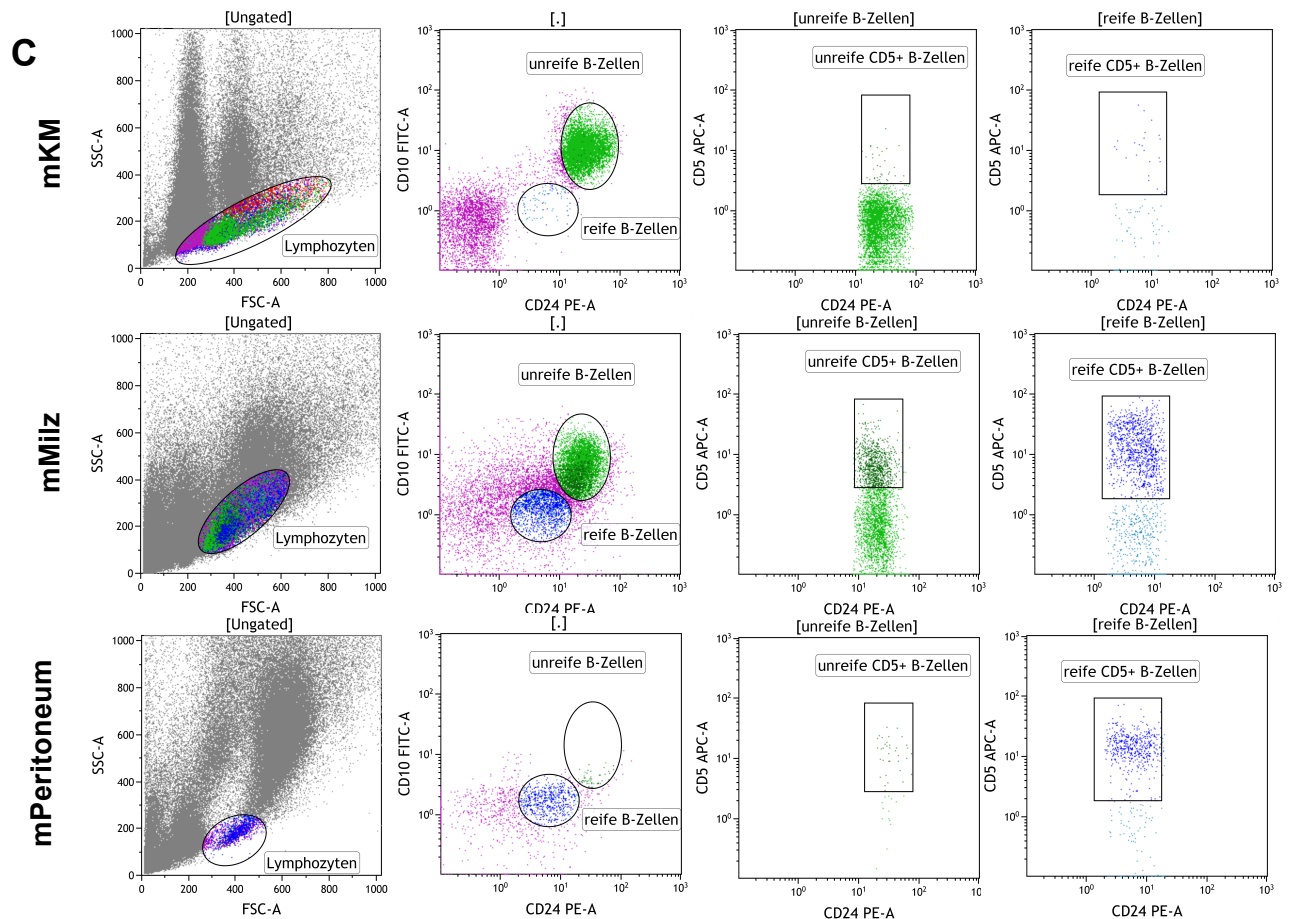


**mMilz**



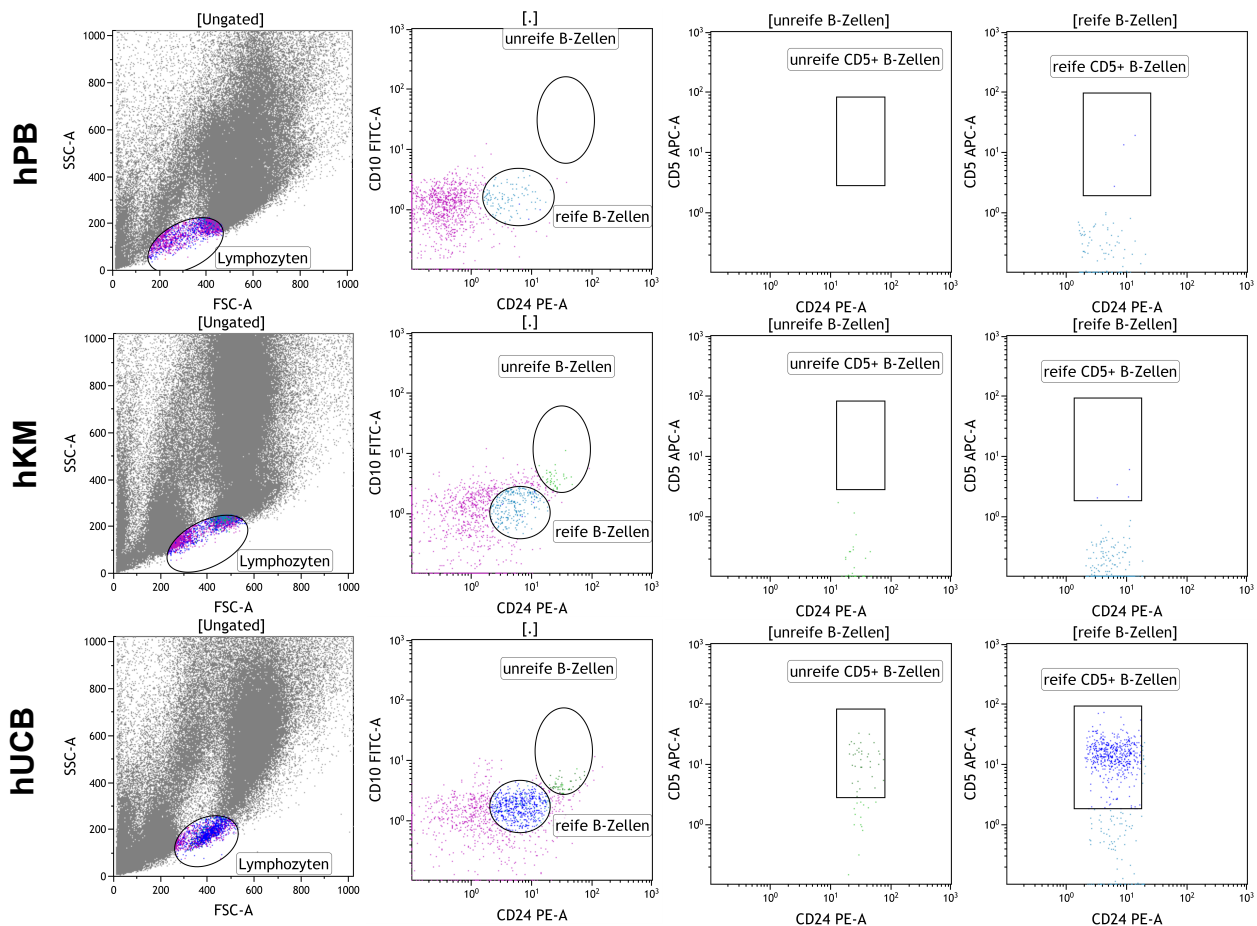
**mPeritoneum**





**Abbildung 21: Analyse rekonstituierter B-Zell-Populationen in verschiedenen Geweben humanisierter Mäuse**

NSG-Mäuse erhielten humane  $CD34^+$  HSC/Vorläuferzellen entweder aus Apheresaten oder Knochenmark adulter Spender oder aus Nabelschnurblut. Nach 12 Wochen wurden B-Zell-Populationen aus Knochenmark, aus der Milz und aus dem Peritoneum der Maus charakterisiert. Gezeigt sind repräsentative Beispiele des Knochenmarks, der Milz und des Peritoneums je einer Maus, die humane  $CD34^+$  HSC/Vorläuferzellen aus (A) Apherese, (B) Knochenmark oder (C) Nabelschnurblut erhalten hatte. Ausschließlich NSG-Mäuse, die HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut erhalten haben, zeigen eine reife  $CD5^+$  B-Zell-Population im Peritoneum.



**Abbildung 22: Analyse reifer B-Zellen in humanisierten Mäusen**

Vergleichende Darstellung der B-Zell-Populationen aus der Bauchhöhle der Mäuse, die mit humanen  $CD34^+$  HSC/Vorläuferzellen unterschiedlicher Quellen transplantiert wurden. Humanes peripheres Blut (hPB), humanes Knochenmark (hKM), humanes Nabelschnurblut (hUCB).

Als zusätzliche Validierung eines möglichen B-1a-B-Zell-Phänotyps der humanen, reifen  $CD5^+$  B-Zellen wurde Blutplasma von vier Mäusen entnommen, welche ebenfalls mit UCB HSC/Vorläuferzellen rekonstituiert wurden und eine deutliche Population an reifen  $CD5^+$  B-Zellen in der Bauchhöhle aufwiesen. Es konnte in ELISA-Assays gezeigt werden, dass eine typische Menge (0,25 – 0,4 g/l) an sezerniertem IgM im Blutplasma dieser Mäuse vorhanden war, wie es auch in lymphozytendefizienten Mäusen, die ausschließlich mit murinen B-1a-Zellen transplantiert wurden, vorzufinden ist. Dies stimmt überein mit der Idee, dass die reifen menschlichen  $CD5^+$  B-Zellen im Peritoneum dieser Mäuse ebenfalls am Aufbau eines natürlichen IgM-Titers beteiligt sind (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst wird ersichtlich, dass humane, reife  $CD5^+$  B-Zellen, wie sie im Peritoneum der humanisierten NSG-Mäuse aufzufinden sind, effizient von ontogenetisch frühen und nicht adulten Stamm- oder Vorläuferzellen gebildet

werden. Weiterhin sind die derart rekonstituierten Mäuse in der Lage, einen normalen IgM-Titer im Blutserum aufzubauen.

### 3.9. BCR-Repertoire humanisierter NSG-Mäuse

An die phänotypische Charakterisierung der generierten B-Zellen in humanisierten NSG-Mäusen, welche HSC/Vorläuferzellen aus verschiedenen Quellen erhalten hatten, schloss sich eine Analyse der IGHV-Gene an. Mittels Klonierung wurden Genumlagerungen für V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4 jeweils für sortierte B-Zellen aus je einer Maus, die HSC/Vorläuferzellen aus adultem Knochenmark oder Nabelschnurblut erhalten hatte, untersucht. Zusätzlich wurden B-Zellen analysiert, welche aus MPPs, angereichert aus Nabelschnurblut, generiert wurden.

Sortiert wurden reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus dem Knochenmark, der Milz und der Bauchhöhle der Maus 12 Wochen nach Transfer der HSC/Vorläuferzellen oder MPPs.

Die Mutationsfrequenzen in reifen B-Zellen aus Mäusen, die HSC/Vorläuferzellen aus adultem Knochenmark, Nabelschnurblut oder MPPs aus Nabelschnurblut erhalten haben, lagen bei jeweils 0,29% (hBM), 0,42% (hUCB), 0,14% (MPP) und 0,41% (LMPP). Damit liegt die mittlere Anzahl der Mutationen pro Sequenz deutlich unter 1, d.h. die analysierten Populationen waren weitgehend unmutiert.

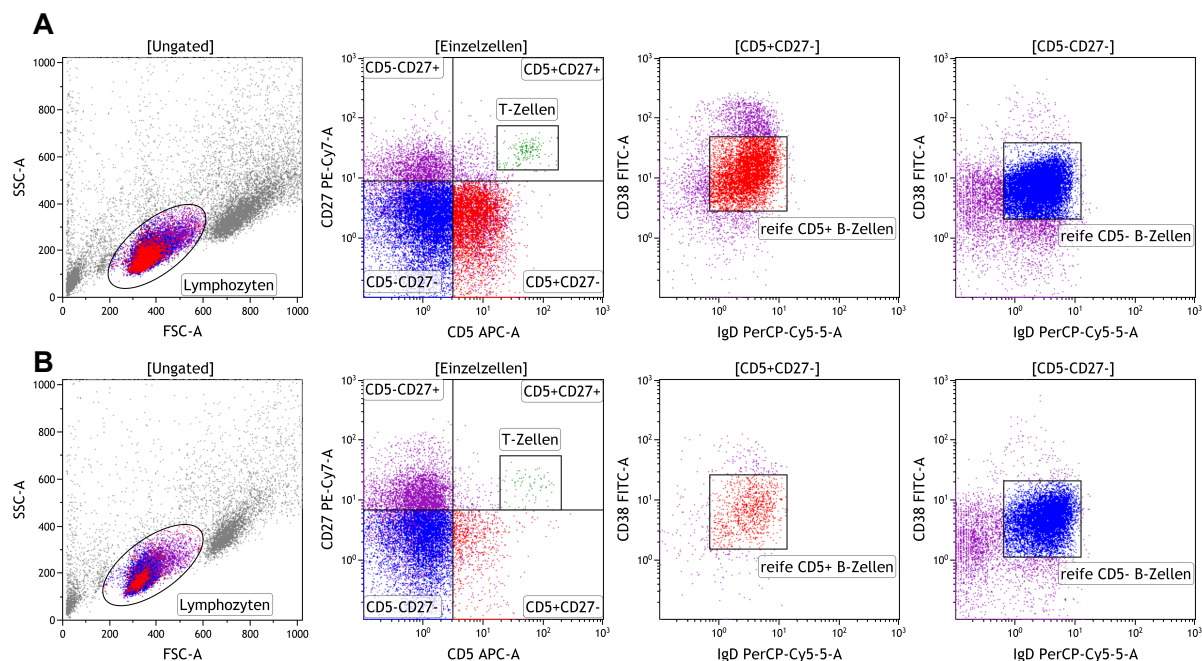
Das IGHV-Gen-Repertoire war normalverteilt, d.h. sehr ähnlich zu normalen B-Zellen (nicht gezeigt), wies jedoch eine Besonderheit auf: Das Segment IGHV4-34 wurde überproportional oft in B-Zellen verwendet, welche in Mäusen generiert wurden, die CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen oder MPP-angereicherte Zellen erhalten haben. Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die aus hUCB oder hUCB MPPs HSC/Vorläuferzellen generiert wurden, nutzen VH4-34 zu 51% unter allen VH4-Segmenten, während reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die aus hKM entstanden sind, dieses Segment zu 30% unter allen verwendeten VH4-Segmenten nutzen. Auch letzterer Anteil erscheint hoch, wie im Vergleich zu PB naive B-Zellen aus Daten in 3.11 ersichtlich wird.

Das häufig verwendete IGHV4-34-Segment ist ein interessanter Hinweis auf eine potentielle poly- oder autoreaktive Spezifität dieser peritonealen B-Zellen – ähnlich zu murinen B-1a-Zellen – da dieses humane IGHV-Segment im unmutiertem Zustand ein bestimmtes Autoantigen, ein Glykoprotein auf Erythrozyten, bindet.

### 3.10. Der relative Anteil humaner PB CD5<sup>+</sup> B-Zellen sinkt mit dem Alter

Wie zuvor beschrieben werden B-1a-Zellen in Mäusen bereits im Fötus angelegt und gebildet. HSC und Vorläuferzellen von adulten Tieren zeigen nur eine eingeschränkte bzw. keine Fähigkeit B-1a-Zellen zu generieren. Dies spiegelt sich in der abnehmenden Menge an Zellen mit steigendem Alter der Maus wider (Barber et al., 2011). Im humanen System ist der Anteil CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Fötus und im Nabelschnurblut von Neugeborenen ebenfalls vergleichsweise hoch (Klein et al., 2001). Wir haben untersucht, inwiefern solche altersbedingten Veränderungen im Anteil humaner, reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen im PB von gesunden Spendern unterschiedlichen Alters ebenfalls vorliegen. Dazu wurden deren angereicherten B-Zellen auf die Zusammensetzung aus verschiedenen B-Zell-Typen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Abbildung 23 veranschaulicht die Verteilung naiver und reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen exemplarisch an je einem jungen und einem älteren Spender.



**Abbildung 23: Beispiele und *Gating*-Strategie zur Ermittlung des Anteils reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen in Abhängigkeit des Spenderalters.**

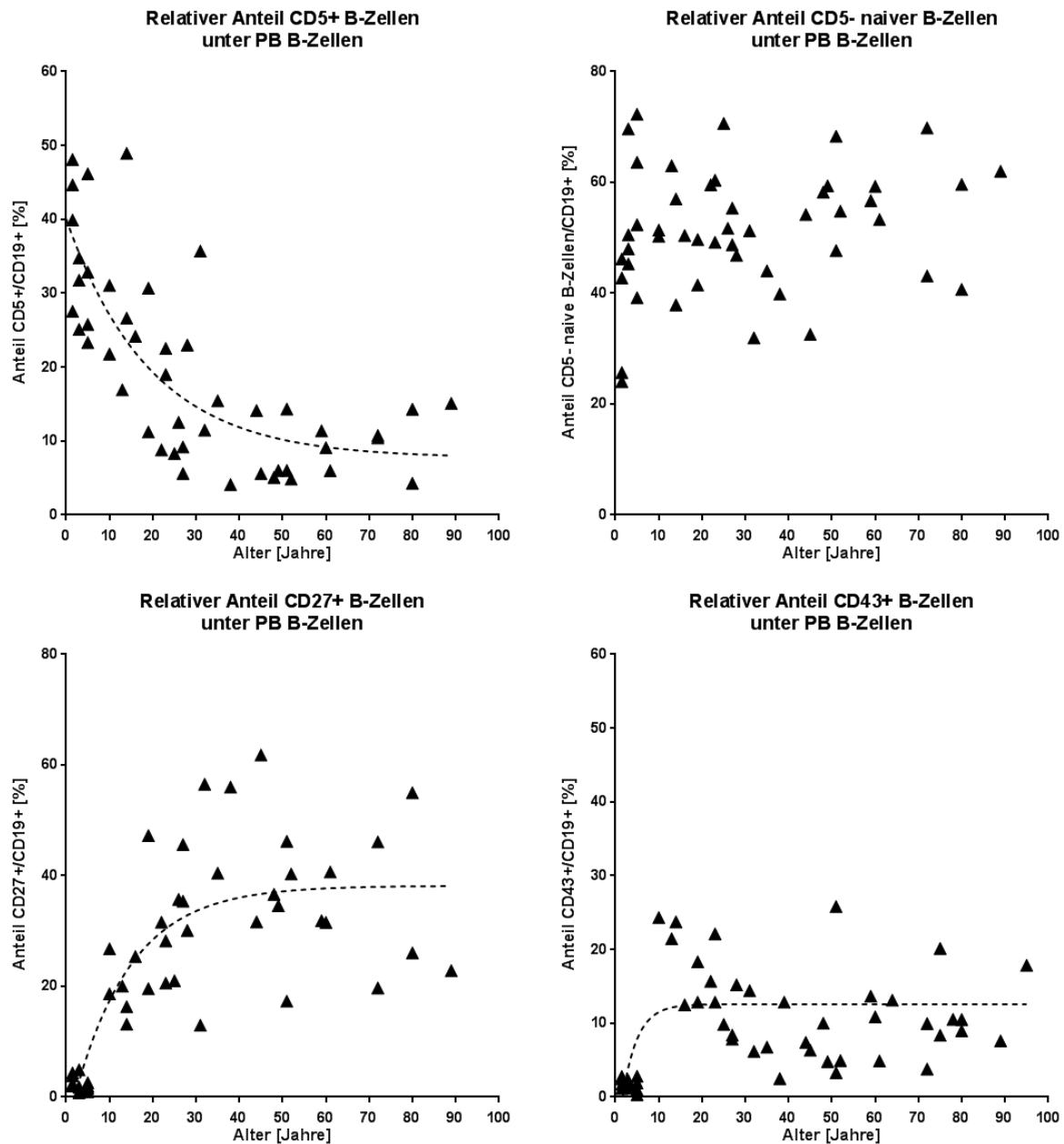
B-Zellen wurden aus PB gesunder Spender isoliert und mittels Durchflusszytometrie für einige B-Zell-Populationen dargestellt. Es werden exemplarisch B-Zellen (A) eines jungen Spenders (19 Jahre) und (B) eines älteren Spenders (61 Jahre) abgebildet. Es wird ersichtlich, dass im jungen Spender anteilig deutlich mehr reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen, unter Ausschluss von transitionellen B-Zellen, vorliegen als im älteren Spender.



Insgesamt wurde PB von 36 gesunden Spendern auf den relativen Anteil CD5<sup>+</sup> B-Zellen unter CD19<sup>+</sup> B-Zellen untersucht und in Abhängigkeit des Spenderalters abgebildet (Abb. 24). Das Alter der Spender lag zwischen 3 Monaten und 89 Jahren. Der Anteil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen im PB lag zwischen 4,1% und 49,9% mit einem Median von 11,5% (der Mittelwert betrug 15,0%). Diese Varianz ergibt sich durch einen deutlichen Trend, der eine anteilige Abnahme von CD5<sup>+</sup> B-Zellen mit steigendem Spenderalter aufzeigt. Diese Abnahme ist besonders zwischen dem 10. und etwa 40. Lebensjahr zu beobachten. Ab dem 40. und bis zum 89. Lebensjahr zeigt der Anteil CD5<sup>+</sup> B-Zellen ein relativ stabiles Minimum mit einem mittleren Anteil von 9,2%.

Wichtig ist, dass diese Tendenz nicht allgemein ist, z.B. für Antigen-unerfahrene B-Zellen nicht vorliegt. Naive B-Zellen zeigen einen gleichbleibenden, eher leicht steigenden Anteil unter der Gesamtzahl der analysierten B-Zellen im Altersverlauf. Wie bereits zuvor mehrfach beschrieben, nimmt der Anteil der Antigen-erfahrenen CD27<sup>+</sup> B-Zellen im Laufe des Lebens zu (Abb. 24) (Morbach 2009).

Unter den CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen konnte kein vergleichbarer Trend festgestellt werden. Lediglich eine Tendenz zur geringen Abnahme der Zellen unter den B-Zellen der jüngsten Spender lässt sich vermuten. Dieser leichte Trend ist in unserer Analyse hauptsächlich durch den Anteil der CD5<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen bedingt (Daten nicht gezeigt). Innerhalb eines Spenders machen CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen einen deutlich geringeren Anteil mit einem Mittelwert von 5,4% im Vergleich zu CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus.



**Abbildung 24: Der relative Anteil reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen im PB gesunder Menschen sinkt mit dem Alter.**

B-Zellen wurden aus PB gesunder Spender isoliert und mittels FACS-Analyse für die oben beschriebenen B-Zell-Populationen ausgewertet. Der relative Anteil reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen, naiver B-Zellen, CD27<sup>+</sup> B-Zellen und CD43<sup>+</sup> B-Zellen unter den Gesamt-B-Zellen wurde in Abhängigkeit des Spenderalters abgebildet. n=47

Zusammengefasst erfüllen humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen, jedoch nicht die zuvor als humanes B-1a-B-Zell-Pendant vorgeschlagenen CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen (oder Plasmablasten), das wichtige B-1a-B-Zell-Kriterium der ontogenetisch frühen Bildung und der stetigen Abnahme mit dem fortschreitenden Lebensalter.



### 3.11. BCR-Repertoire reifer humaner CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB

#### 3.11.1. Etablierung der IGHV-Repertoire-Tiefensequenzierung

Eine Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Bestimmung des BCR-Repertoires von B-Zell-Populationen, die erlaubt, amplifizierte Sequenzen einzelner Ursprungszellen voneinander unterscheiden zu können, auch wenn deren IGHV-Gen-Umlagerungen identisch sind. Diese Methode soll dem Anspruch genügen, innerhalb einer B-Zell-Population die absolute Nutzung von IGHV-Genen, die klonale Zusammensetzung (Klonalität), die jeweilige Klongröße sowie den Mutationsstatus und CDRIII-Komposition quantifizieren zu können. Hierzu wurde eine Sequenzreaktion etabliert, die rearrangierte IGHV-Gene in einem ersten Kopierschritt mit einem einzigartigen molekularen Code (UMI) aus zwölf willkürlichen Nukleotiden versieht. Die Methode wurde modifiziert nach Kinde et al. (Kinde et al., 2011). Die drei größten V<sub>H</sub>-Familien (V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4) und somit ca. 90% der IGHV-Gen-Umlagerungen werden analysiert. In anschließenden PCR-Zyklen werden diese primär abgeschriebenen DNA-Moleküle amplifiziert und mit Adaptersequenzen versehen. Entsprechend tragen Sequenzen, die aus einem Ursprungsmolekül vervielfältigt wurden, identische UMIs, während aus verschiedenen IGHV-Gen-Umlagerungen generierte Sequenzen verschiedene UMIs tragen. Die ausgegebenen Sequenzen werden bioinformatisch in Kooperation mit dem Institut für Bioinformatik an der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. Daniel Hoffmann) ausgewertet.

Ziel der IGHV-Tiefensequenzierung war die vergleichende Analyse des IGHV-Repertoires in CD5<sup>+</sup> B-Zellen und naiven B-Zellen aus PB gesunder Spender. Diese Analyse erfolgte an bis zu sechs Spendern parallel zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Set#1-3), um einen möglichen zeitlichen Verlauf, bzw. eine molekulare Verwandtschaft verschiedener B-Zell-Populationen, messen zu können. In Set#1 waren 6 Spender enthalten von denen zwei ausgewählt (Alter 36 und 44 Jahre) und mit einem zusätzlichen Spender (Alter 38 Jahre) in Set#2 und 3 erneut analysiert wurden (siehe auch Tabelle S2 im Anhang).

Die bioinformatische Vorgehensweise wird im Material und Methodenteil (2.14.3.1) detailliert beschrieben. Zunächst wurden die Sequenzinformationen aus Read 1 und Read 2, sofern die Qualität der Sequenzen dies zuließ, zusammengeführt. Sequenzen mit demselben UMI wurden als eine einzelne Sequenz gezählt und somit PCR-induzierte Replikate auf eins reduziert (kollabiert). Dieses Vorgehen hat den

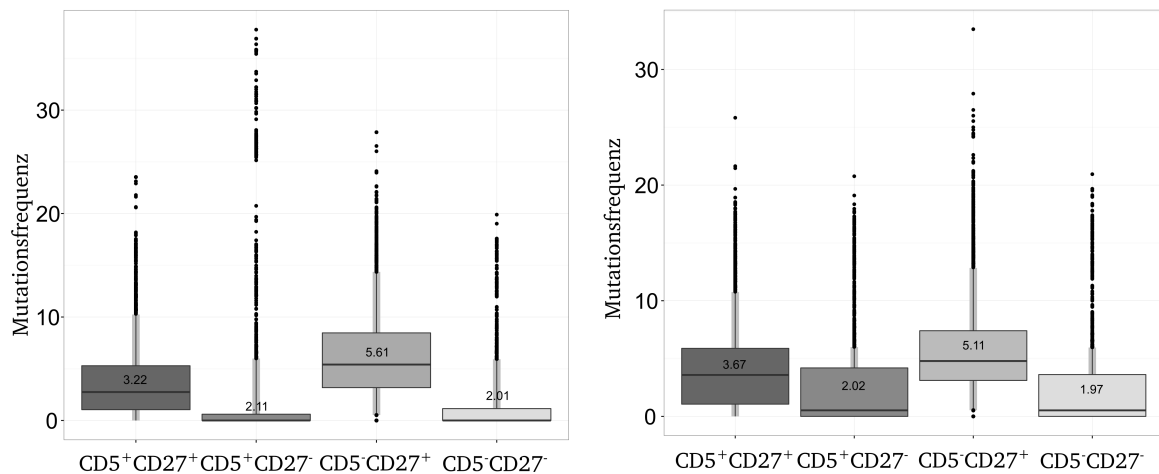
Vorteil, dass die Anzahl der von diesem Schritt an analysierten Sequenzen der Anzahl der initial vervielfältigten Allele entspricht. Vor dieser Kollabierung wurden aus Set#1 nur solche Sequenzen weiter bearbeitet, die mindestens zweifach vorlagen. Dies war dazu gedacht die Anzahl artifizieller Sequenzen, die vorwiegend nur einmal vorkommen sollten, zu verringern. Dieses Vorgehen (bislang nur für Set#1 durchgeführt) reduzierte jedoch die verfügbaren Sequenzen für die schließlich IGHV-Gen-Analyse drastisch (siehe Tabelle S2), während Parameter wie IGHV-Nutzung und Klonalität durch die höher angelegte Sequenzabdeckung (*coverage*) nicht signifikant beeinflusst wurden (Daten nicht gezeigt, bzw. Set#2 und 3 noch in Bearbeitung).

Die bisher für die Analyse verwendeten Sequenzzahlen nach jedem Filterschritt werden für alle Proben (sofern verfügbar) in der Tabelle S2 im Anhang aufgeführt. In Folgenden wurden die übrigen IGHV-Sequenzen auf ihre Mutationsfrequenzen, IGHV-Gen-Nutzung und Klonalität untersucht.

### **3.11.2. Erste IGHV-Tiefensequenzierung reifer CD5<sup>+</sup> und naiver B-Zellen**

In die erste Sequenzierung (Set#1) sind PCR-Produkte von IGHV-Genen aus sechs gesunden Spendern eingegangen. Analysiert wurden sortierte CD5<sup>+</sup> B-Zellen (CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) und naive B-Zellen (CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) aus PB. Zu Vergleichszwecken wurden Gedächtnis-B-Zellen (CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> und CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) ebenfalls analysiert.

Es stellte sich heraus, dass die zuvor als IGHV-unmutiert bestimmten Populationen reifer CD5<sup>+</sup> und naiver B-Zellen in der quantitativen Tiefensequenzierung eine Mutationsfrequenz von bis zu 2,55% (Mittelwert) eindeutig mutierter Sequenzen aufwiesen (zwei Beispiele in Abbildung 25).



**Abbildung 25: Mutationsfrequenzen der amplifizierten IGHV-Gen-Umlagerungen (Set#1).**

CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> und CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> sowie CD5<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B-Zellen wurden aus PB sortiert, V<sub>H</sub>-Gene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die gezeigten Mutationsfrequenzen ergeben sich aus dem Zusammenschluss beider Doppelansätze jeder Probe. Die schwarze Linie markiert den Median, die Box deckt 95% aller Sequenzen ab, die grauen Balken weitere 2,5% und die Punkte weitere 2,5%. Die Zahlen geben die Mittelwerte an. Gezeigt sind Daten für zwei Spender von insgesamt sechs Spendern.

Da das verwendete Sortierschema in diesem Fall eine Kontamination mit CD27<sup>-</sup> post-GC-B-Zellen nicht ausschließen konnte, die die Ergebnisse theoretisch empfindlich verzerren konnten, musste die Sortierstrategie modifiziert werden.

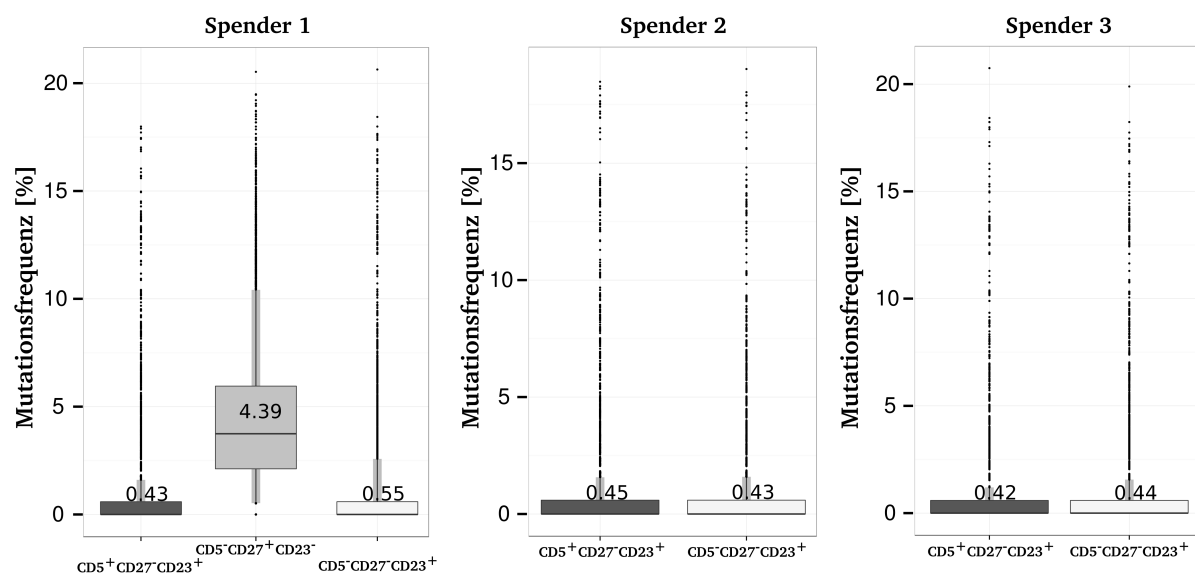
### 3.11.3. IGHV-Tiefensequenzierung Antigen-unerfahrener reifer CD5<sup>+</sup> und konventioneller naiver B-Zellen

Aus den Analysen der IGHV-Sequenzierung der Proben aus Set#1 geht hervor, dass sowohl naive B-Zellen als auch CD5<sup>+</sup> B-Zellen wahrscheinlich mit einem geringen Anteil Antigen-erfahrener B-Zellen kontaminiert waren. Daher wurden reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen und naive B-Zellen erneut sortiert, allerdings unter zusätzlicher Berücksichtigung der CD23-Ausprägung, eines typischen Markers für Antigen-unerfahrene B-Zellen (Set#2). Entsprechend wurden die Zellen als reife CD5<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) und naive (CD5<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) B-Zellen von drei ausgewählten Spendern aus Set#1 sortiert und erneut eine Tiefensequenzierung ihrer IGHV-Gen-Umlagerungen durchgeführt. Von Spender 1 wurden außerdem Antigen-erfahrene Gedächtnis-B-Zellen (CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>)

isoliert; alle Proben wurden in unabhängigen Duplikaten (A und B) parallel prozessiert.

### 3.11.4. IGHV-Mutationsanalyse Antigen-unerfahrener PB B-Zellen

Die Mutationsfrequenzen der IGHV-Gen-Umlagerungen der  $CD5^+CD27^-$  sowie  $CD5^-CD27^-$  B-Zellen lagen im Mittel bei 0,43% bzw. 0,47%. Für  $CD5^-CD27^+$  Gedächtnis-B-Zellen lag die mittlere Mutationsfrequenz bei 4,39% (Abb. 26). Die mittlere Mutationsfrequenz der Doppelansätze A und B waren identisch (nicht gezeigt).



**Abbildung 26: Mutationsfrequenzen der amplifizierten IGHV-Gen-Umlagerungen (Set#2).**

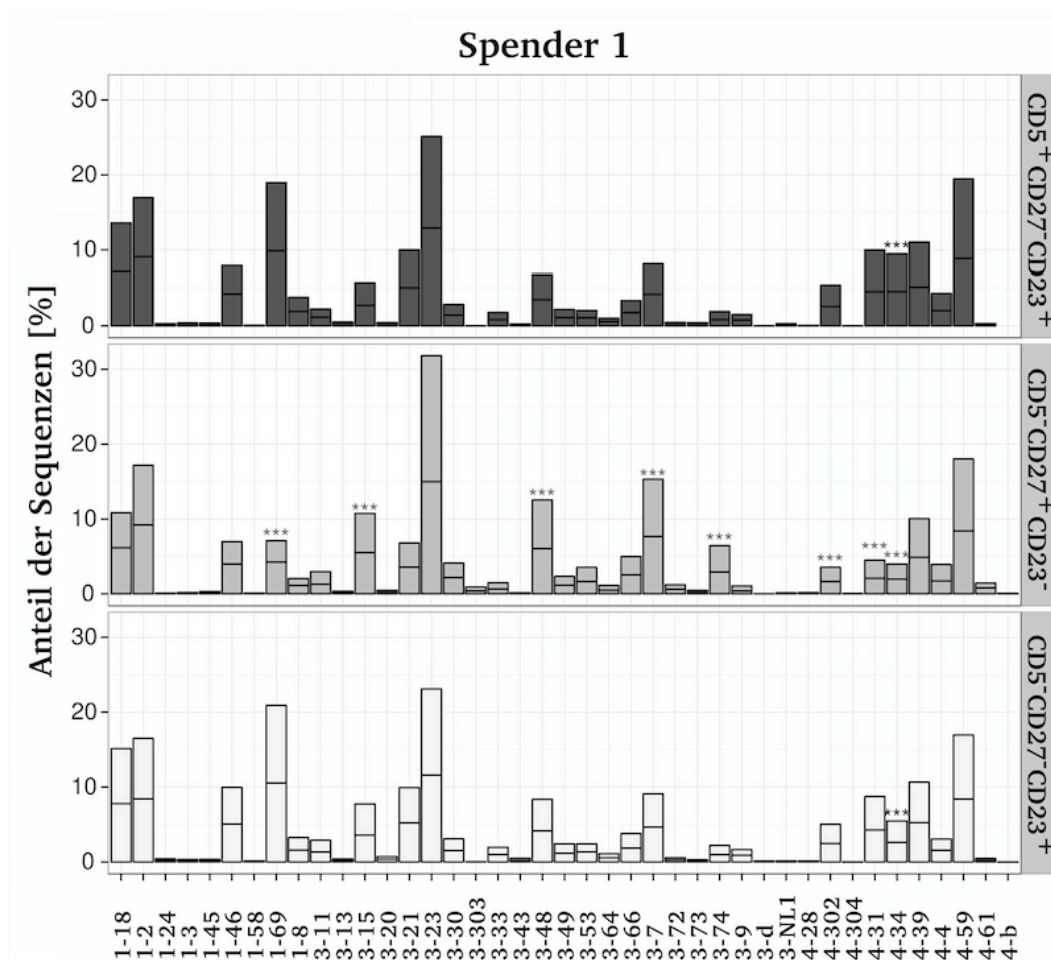
$CD5^+CD23^+CD27^-IgD^+CD38^{low}$  und  $CD5^-CD23^+CD27^-IgD^+CD38^{low}$  sowie  $CD5^-CD23^-CD27^+IgD^+$  B-Zellen wurden aus PB sortiert, rearrangierte  $V_H$ -Gene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die gezeigten Mutationsfrequenzen ergeben sich aus dem Zusammenschluss beider Doppelansätze jeder Probe. Die schwarze Linie markiert den Median, die Box deckt 95% aller Sequenzen ab, die grauen Balken weitere 2,5% und die Punkte weitere 2,5%. Die Zahlen geben die Mittelwerte an.

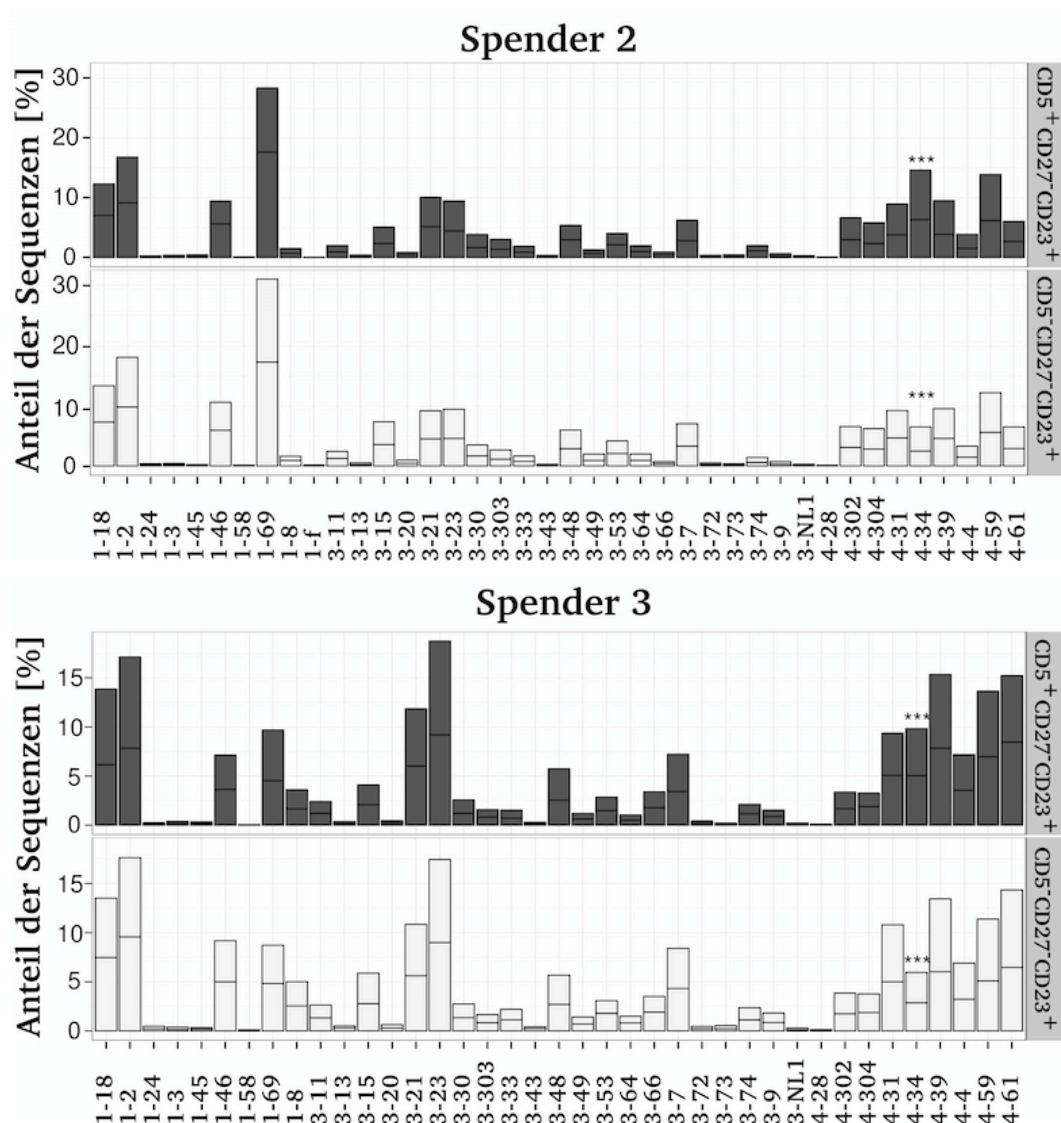
Die niedrige Mutationsfrequenz der  $CD5^+CD27^-$  B-Zellen unterstützt die Annahme, dass es sich um GC-unerfahrene Zellen handelt und die gewünschten Populationen mit der erneuten Sortierstrategie nun in ausreichender Reinheit vorliegen.

### 3.11.5. IGHV-Gen-Nutzung Antigen-unerfahrener PB B-Zellen

Von besonderem Interesse ist die IGHV-Nutzung reifer  $CD5^+$  B-Zellen im Vergleich zu naiven B-Zellen, da dies Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Generierung, oder Antigen-spezifität beider Populationen sein könnten. Die  $V_H$ -Gen-Sequenzen wurden den bekannten  $V_H1$ -,  $V_H3$ - und  $V_H4$ -Segmenten zugeordnet (Abb. 27).

Das  $V_H$ -Gen-Repertoire von reifen  $CD5^+$  B-Zellen adulter Spender unterscheidet sich im Wesentlichen nicht von dem der naiven B-Zellen. Als unterschiedlich genutzte  $V_H$ -Segmente gelten solche, die mindestens doppelt so häufig und in mindestens 5% aller IGHV-Gen-Umlagerungen vertreten sind. Einziger Befund war eine signifikant häufigere Nutzung von IGHV4-34 in  $CD5^+$  B-Zellen gegenüber naiven B-Zellen in allen drei Spendern. Die wie erwartet großen Unterschiede in der IGHV-Nutzung zwischen Gedächtnis-B-Zellen und  $CD5^+$  bzw. naiven B-Zellen sind auf die BCR-vermittelte Selektion durch Antigeninteraktion der Gedächtnis-B-Zellen zurückzuführen. Die Duplikate (A und B) zeigten eine nahezu identische Verteilung in der IGHV-Gen-Nutzung (Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 27: IGHV-Nutzung reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB im Vergleich zu naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen.**

CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> und CD5<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> sowie CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B-Zellen wurden aus PB sortiert, umgelagerte V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4-Gene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Daten zeigen die IGHV-Segment-Nutzung der Populationen, kombiniert aus beiden prozessierten Duplikaten. Signifikant unterschiedlich häufig genutzte IGHV-Segmente zwischen den Populationen sind mit \*\*\* gekennzeichnet (mindestens 2-fach so häufig mit mindestens 5% Anteil unter allen Sequenzen).

### 3.11.6. Klonalitätsanalyse von PB CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B-Zellen

Identische Sequenzen mit unterschiedlichen UMLs verweisen auf klonale Verwandtschaft dieser Sequenzen. Zusätzlich erlaubt die parallele Prozessierung von technischen Duplikaten (siehe oben) eine Verifizierung klonaler Expansionen. Als Klone wurden nur Sequenzen gezählt, die ausschließlich in beiden Duplikaten

einer Probe auftraten. Die dargestellten Daten in Tabelle 2 beziehen sich auf die Gesamtzahlen der drei analysierten Spender.

Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen zeigten eine sehr niedrige Klonalität mit einem Anteil klonaler Sequenzen von 0,04%, naive B-Zellen von 0,13% und B-Gedächtniszellen von 33,05%. Naive B-Zellen gelten als nicht klonal expandiert. CD5<sup>+</sup> B-Zellen liegen in ihrem klonalen Anteil unter dem von naiven B-Zellen und entsprechen damit ebenfalls nicht klonal expandierten B-Zellen. Im Vergleich dazu besitzen Gedächtnis-B-Zellen einen zu erwartend hohen Anteil klonaler Sequenzen (Tabelle 2).

Zusammengefasst zeigt die IGHV-Klonalitätsanalyse, dass in adulten Spendern reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen wie naive B-Zellen nicht – oder nur minimal – klonal expandiert sind. Der Anteil klonal expandierter Sequenzen unter den Gedächtnis-B-Zellen liegt dagegen im zuvor beschriebenen Bereich von bis zu 45% der PB B-Zellen (Budeus et al., 2015), ein wichtiger Beweis, dass die verwendete Methode geeignet ist für die Fragestellungen.

**Tabelle 2: Klonale Zusammensetzung humaner, reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen, naiver B-Zellen und IgD<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen aus PB.**

Population		Gesamtanzahl der Sequenzen* (Spanne)	Anzahl der Klone** (Spanne)	Anzahl der klonalen Sequenzen*** (Spanne)	Anteil klonaler Sequenzen [%] (Spanne)
Reife CD5 <sup>+</sup> B-Zellen; n=3	CD5 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>low</sup>	44933 (13194-17138)	5 (1-3)	16 (4-8)	0,04 (0,02-0,06)
Naive B-Zellen; n=3	CD5 <sup>-</sup> CD23 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>low</sup>	53946 (10438-19932)	18 (0-14)	71 (0-56)	0,13 (0-0,24)
IgD <sup>+</sup> B-Gedächtnis-zellen; n=1	CD5 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	8246	570	2725	33,05

\*Anzahl der gesamten Sequenzen kombiniert aus beiden parallelen Ansätzen.

\*\*Anzahl der Klone, welche in beiden parallelen Ansätzen zu finden waren.

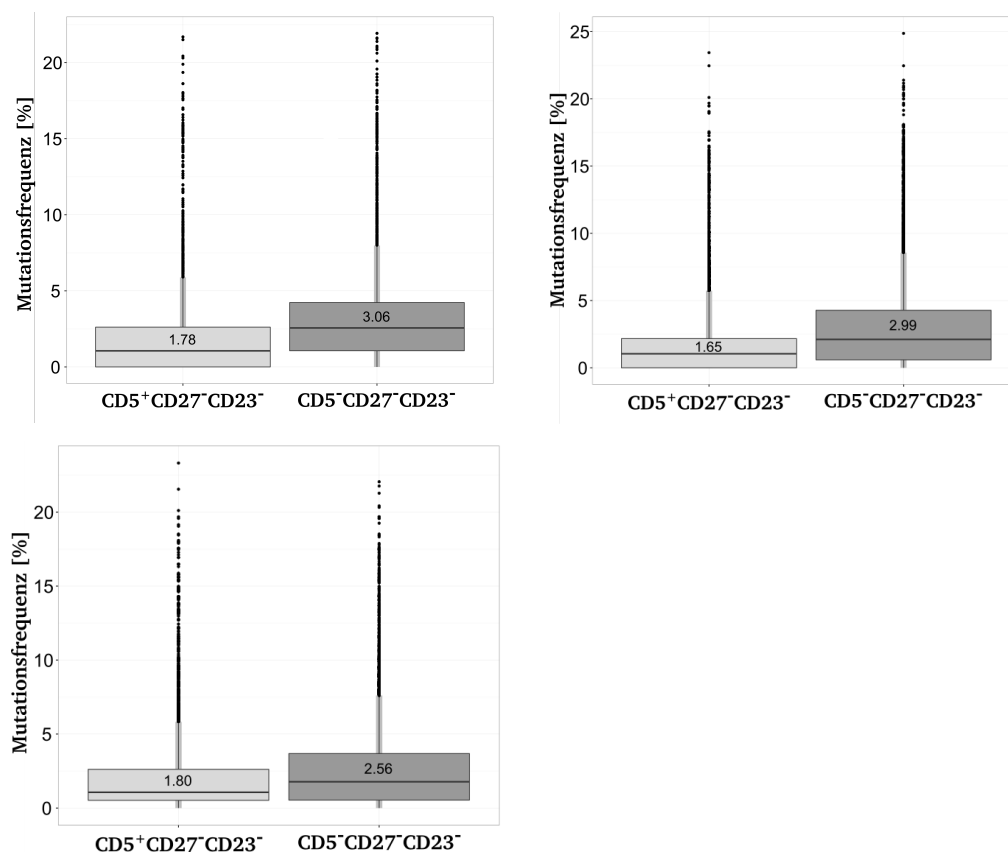
\*\*\*Anzahl der klonalen gesamten Sequenzen aus Klonen, welche in beiden parallelen Ansätzen zu finden waren.

### 3.11.7. IGHV-Mutations- und Klonalitätsanalyse Antigen-erfahrener CD5<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup> Gedächtnis-B-Zellen

Die Tiefensequenzierung von Set#1 zeigte, dass unter reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen (CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) und naiven B-Zellen (CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) ein gewisser Anteil IGHV-mutierter, klonal expandierter B-Zellen existiert. Daraufhin wurde in

einem weiteren Experiment (Set#2) zusätzlich CD23-Ausprägung in der Zellisolierung berücksichtigt, um solche Antigen-erfahrenen B-Zellen auszuschließen. Diese vermuteten „frühen Gedächtnis-B-Zellen“ wurden in einem unabhängigen Set#3 gezielt angereichert und als „CD5<sup>+</sup> frühe Gedächtnis-B-Zellen“ (CD5<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) und „CD5<sup>-</sup> frühe Gedächtnis-B-Zellen“ (CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) sortiert und ebenfalls auf BCR-Repertoire, Mutationsstatus und Klonalität getestet.

Tatsächlich konnte durch die Analyse von Set#2 und Set#3 bestätigt werden, dass die Ausprägung von CD23 die typischen, reifen, Antigen-unerfahrenen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen charakterisiert, während die zuvor in Set#1 detektierten kontaminierenden frühen Gedächtnis-B-Zellen eindeutig den CD23<sup>-</sup> B-Zell-Populationen zugewiesen werden konnten. Die Mutationsfrequenz der letzteren beiden Populationen lag deutlich über dem von in Set#2 analysierten echten, reifen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen mit einer mittleren Mutationsfrequenz von 1,74% in CD5<sup>+</sup> frühen Gedächtnis-B-Zellen und 2,87% in CD5<sup>-</sup> frühen Gedächtnis-B-Zellen (Abb. 28).



**Abbildung 28: IGHV-Mutationsfrequenzen von CD5<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup> frühen Gedächtnis-B-Zellen (Set#3).**

PB CD5<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen wurden isoliert, V<sub>H</sub>-Gene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die gezeigten Mutationsfrequenzen



ergeben sich aus den vereinigten Verteilungen beider Duplikate jeder Probe. Die schwarze Linie markiert den Median, die Box deckt 95% aller Sequenzen ab, die grauen Balken weitere 2,5% und die Punkte weitere 2,5%. Die Zahlen geben die Mittelwerte an.

Die Klonalität der Antigen-erfahrenen  $CD5^+CD23^-CD27^-IgD^+$  und  $CD5^-CD23^-CD27^-IgD^+$  B-Zellen aus Set#3 der drei Spender entspricht im Mittel einem Anteil klonaler Sequenzen von 0,07% bzw. 1,57% (Tabelle 3). Damit liegen beide B-Zell-Populationen über dem Anteil klonaler Sequenzen von reifen  $CD5^+$  und konventionellen naiven B-Zellen aus Set#2 und unter dem Niveau der Gedächtnis-B-Zellen aus Set#2.

**Tabelle 3: Klonale Zusammensetzung humaner  $CD5^+CD23^-CD27^-$  und  $CD5^-CD23^-CD27^-$  B-Zellen aus PB.**

Population		Anzahl der gesamten Sequenzen* (Spanne)	Anzahl der Klone** (Spanne)	Anzahl der klonalen Sequenzen*** (Spanne)	Anteil klonaler Sequenzen [%] (Spanne)
$CD5^+$ B-Zellen; n=3	$CD5^+CD23^-CD27^-IgD^+CD38^{low}$	39367 (11657-15859)	29 (5-14)	96 (12-57)	0,07
$CD5^-$ B-Zellen; n=3	$CD5^-CD23^-CD27^-IgD^+CD38^{low}$	38928 (11625-15579)	613 (98-289)	2531 (508-1173)	1,57

\*Anzahl der gesamten Sequenzen kombiniert aus beiden parallelen Ansätzen je Population und aus drei Spendern.

\*\*Anzahl der Klone, welche in beiden parallelen Ansätzen zu finden waren.

\*\*\*Anzahl der klonalen gesamten Sequenzen aus Klonen, welche in beiden parallelen Ansätzen zu finden waren.

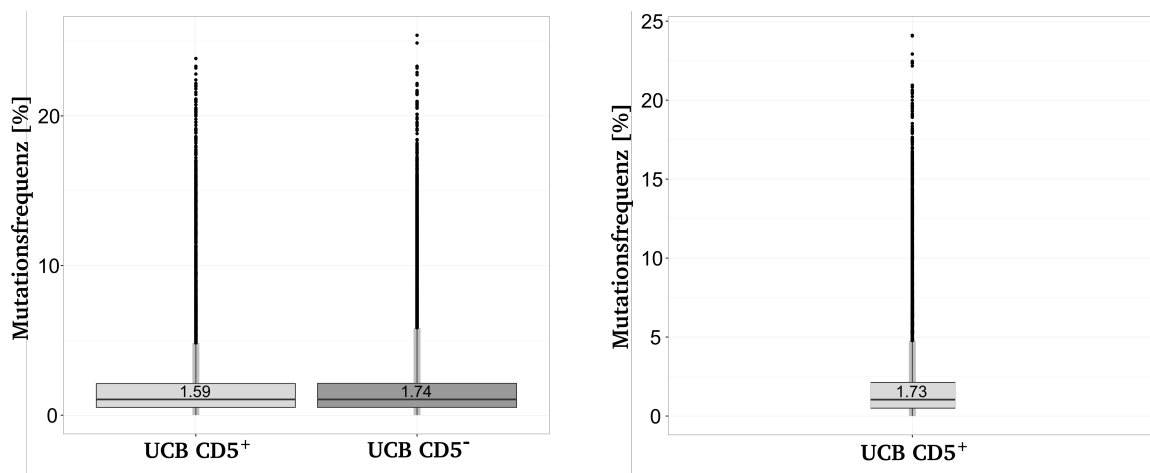
### 3.12. BCR-Repertoire aus B-Zellen des Nabelschnurbluts

Neben reifen  $CD5^+$  und konventionellen naiven B-Zellen aus PB adulter Spender wurden beide Zelltypen ebenfalls aus Nabelschnurblut gewonnen. Da Nabelschnurblut einen überaus hohen Anteil transitioneller B-Zellen, dafür jedoch praktisch keine Antigen-erfahrenen B-Zellen enthält, wurden reife  $CD5^+$  und konventionelle naive B-Zellen mittels folgender Sortierstrategie aufgereinigt:  $CD5^+CD10^{low}CD24^{low}IgD^+$  und  $CD5^-CD10^{low}CD24^{low}IgD^+$ . Die derart isolierten B-Zellen des Nabelschnurblutes wurden ebenfalls auf ihr IGHV-Repertoire, Mutationsstatus und Klonalität mittels Tiefensequenzierung hin getestet. Aus einer

Spenderprobe konnten reife  $CD5^+$  sowie  $CD5^-$  B-Zellen, aus einem weiteren Spender  $CD5^+$  B-Zellen, gewonnen und analysiert werden.

### 3.12.1. IGHV-Mutationsanalyse aus $CD5^+$ und $CD5^-$ B-Zellen aus Nabelschnurblut

Die durchschnittliche Mutationsfrequenz der reifen  $CD5^+$  B-Zellen aus Nabelschnurblut betrug 1,66%, die der korrespondierenden naiven B-Zellen lag bei 1,74% (Abb. 29). Damit liegt die durchschnittliche Mutationsfrequenz beider Populationen leicht über der von naiven und  $CD5^+$  B-Zellen aus PB (Set#2) und unter der von Gedächtnis-B-Zellen, was bedeutet, dass zumindest ein Teil der enthaltenen Sequenzen vereinzelte IGHV-Mutationen aufweist.



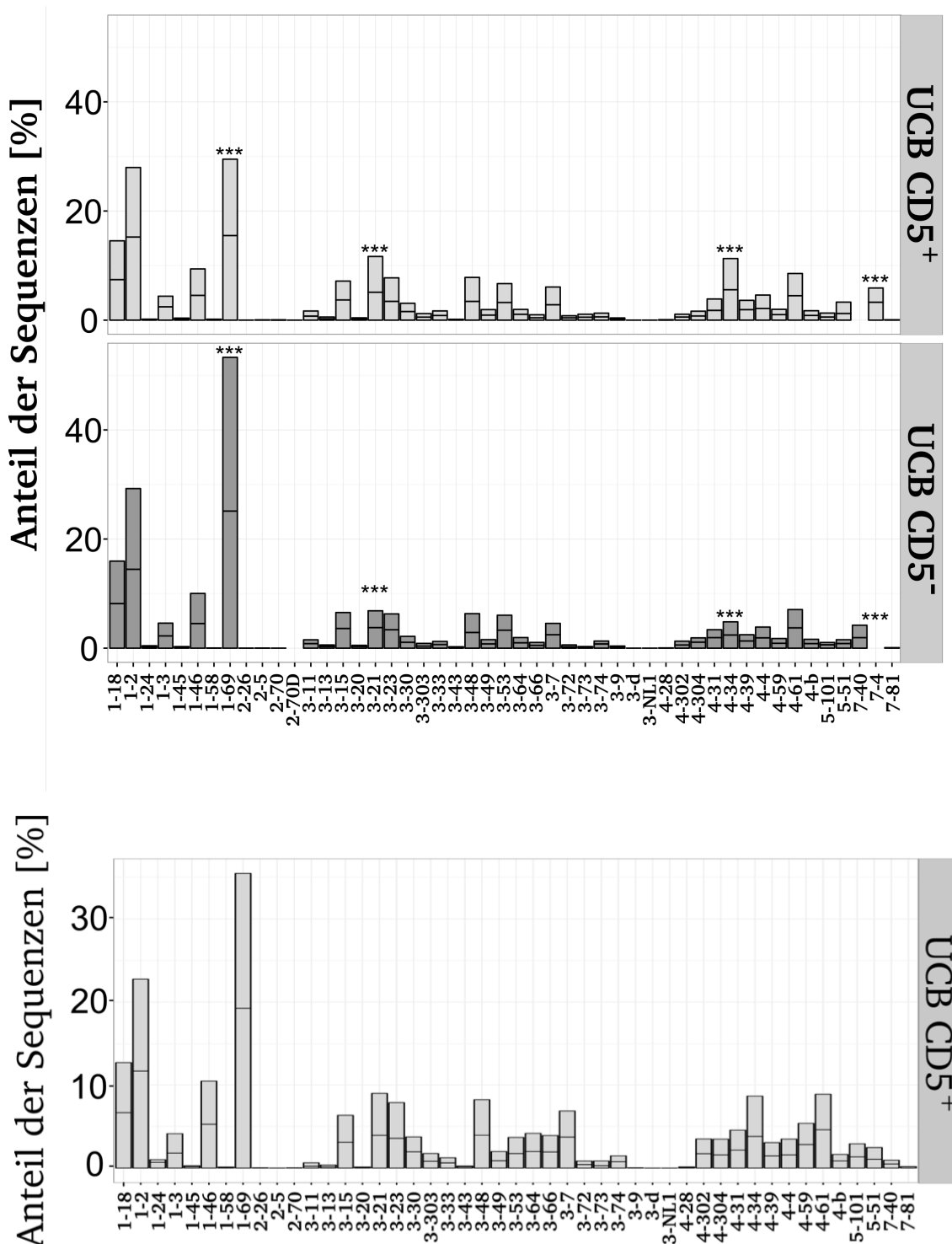
**Abbildung 29: IGHV-Mutationsfrequenzen aus reifen  $CD5^+$  und naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut.**

Reife  $CD5^+CD23^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$  und  $CD5^-CD23^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$  B-Zellen wurden aus Nabelschnurblut sortiert, umgelagerte  $V_H$ -Gene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die gezeigten Mutationsfrequenzen ergeben sich aus dem Zusammenschluss beider Doppelansätze jeder Probe. Die schwarze Linie markiert den Median, die Box deckt 95% aller Sequenzen ab, die grauen Balken weitere 2,5% und die Punkte weitere 2,5%. Die Zahlen geben die Mittelwerte an.

### 3.12.2. IGHV-Gen-Nutzung von reifen $CD5^+$ und naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut

Die IGHV-Nutzung der reifen  $CD5^+$  und naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut des ersten Spenders unterschied sich signifikant in bestimmten IGHV-Segmenten, dazu gehörten  $V_H1-69$ ,  $V_H3-21$ ,  $V_H4-34$  und  $V_H7-4$  (Abb. 30).  $CD5^+$  B-Zellen des zweiten

Spenders wiesen ähnliche Muster, insbesondere den hohen Anteil VH4-34-Segmente auf.



**Abbildung 30: IGHV-Gen-Nutzung von reifer CD5<sup>-</sup> und naiver B-Zellen aus Nabelschnurblut.**

CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>low</sup>IgD<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>low</sup>IgD<sup>+</sup> B-Zellen wurden aus PB sortiert, umgelagerte V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4-Gene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Daten zeigen die IGHV-Segmentnutzung der Populationen kombiniert aus beiden Doppelansätzen. Signifikant unterschiedlich häufig genutzte

IGHV-Segmente zwischen den Populationen sind mit \*\*\* gekennzeichnet (mindestens 2-fach so häufig mit mindestens 5% Anteil unter allen Sequenzen).

### 3.12.3. Klonale Zusammensetzung reifer CD5<sup>+</sup> und naiver B-Zellen aus Nabelschnurblut

Der durchschnittliche Anteil klonal verwandter Sequenzen unter reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus Nabelschnurblut betrug 0,34% gegenüber den korrespondierenden naiven B-Zellen mit 0,03% (Tabelle 4). Damit ist, im Vergleich zu den B-Zellen im adulten PB (Set#2), ein relativ hoher Anteil der reifen CD5<sup>+</sup>, jedoch nicht naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut klonal expandiert.

**Tabelle 4: Klonale Zusammensetzung humaner, reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen und naiver B-Zellen aus Nabelschnurblut.**

Population		Anzahl der gesamten Sequenzen* (Spanne)	Anzahl der Klone** (Spanne)	Anzahl der klonalen Sequenzen *** (Spanne)	Anteil klonaler Sequenzen [%] (Spanne)
CD5 <sup>+</sup> B-Zellen; n=2	CD5 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>low</sup>	153773 (70445-83328)	525 (32-493)	2556 (174-2382)	0,34
CD5 <sup>-</sup> B-Zellen; n=1	CD5 <sup>-</sup> CD23 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>low</sup>	82917	24	125	0,03

\*Anzahl der gesamten Sequenzen kombiniert aus beiden parallelen Ansätzen je Population und aus zwei Spendern.

\*\*Anzahl der Klone, welche in beiden parallelen Ansätzen zu finden waren.

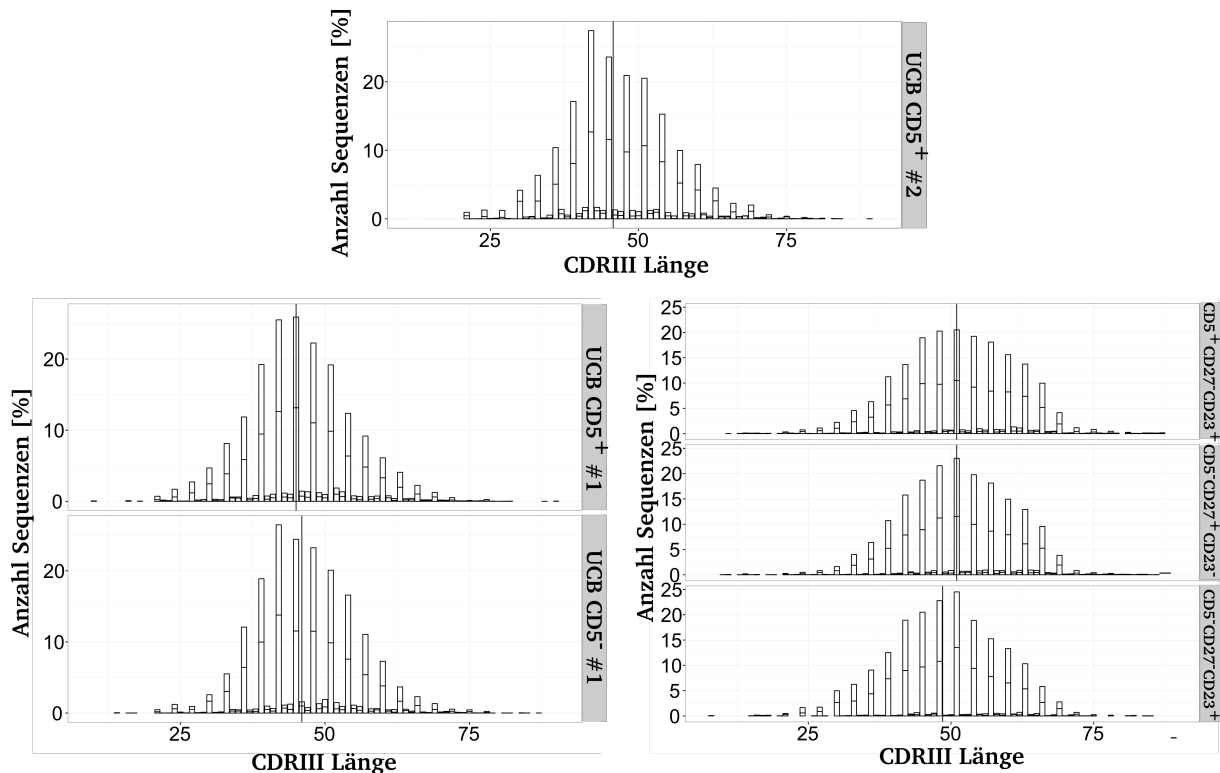
\*\*\*Anzahl der klonalen gesamten Sequenzen aus Klonen, welche in beiden parallelen Ansätzen zu finden waren.

### 3.12.4. CDRIII-Länge als Maß für den N-Nukleotid-Gehalt in IGHV-Gen-Umlagerungen

Die CDRIII-Längenverteilung einer B-Zell-Population kann Hinweise auf Selektion und klonale Expansion enthalten. Bei murinen B-1a-Zellen ist eine kürzere CDRIII-Länge gegenüber B-2-Zellen auf die ontogenetisch frühe Entwicklung und den damit verbundenen fehlenden Einbau von N-Nukleotiden zurückzuführen.

Die hier analysierten B-Zellen aus Nabelschnurblut sowie PB wiesen annähernd normalverteilte CDRIII-Längen auf, was für polyklonale Populationen ohne große klonale Expansionen spricht. Dies bestätigen die Befunde aus den Klonalitätsanalysen mittels IGHV-Repertoire-Analyse. Die durchschnittliche CDRIII-

Länge reifer  $CD5^+$  B-Zellen aus Nabelschnurblut betrug 45,4 (45,0 und 45,8) Nukleotide gegenüber naiven B-Zellen mit 46 Nukleotiden. Im Vergleich zeigten Proben aus PB (Set#2) für reife  $CD5^+$  B-Zellen im Schnitt eine CDRIII-Länge von 51 Nukleotiden, naive B-Zellen von 48,6 Nukleotiden und Gedächtnis-B-Zellen von 51 Nukleotiden (Abb. 31).



**Abbildung 31: CDRIII-Längenverteilung der IGHV-Gene der  $CD5^+$  und  $CD5^-$  B-Zellen aus Nabelschnurblut.**

Reife  $CD5^+CD23^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$  und  $CD5^-CD23^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$  B-Zellen wurden aus Nabelschnurblut sortiert, umgelagerte  $V_H$ -Gene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die CDRIII-Längenverteilung wurde für reife  $CD5^+$  und  $CD5^-$  B-Zellen aus Nabelschnurblut (oben und links) sowie für reife  $CD5^+$  B-Zellen, naive B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen aus PB (rechts) dargestellt. Die vertikale Linie markiert die durchschnittliche CDRIII-Länge einer Population.

Zu der CDRIII-Längenanalyse ist zu sagen, dass die leicht kürzeren CDRIII der Nabelschnurblut B-Zellen ein interessanter Hinweis auf eine reduzierte N-Nukleotid-Insertion im Repertoire deren IGHV-Gen-Umlagerungen darstellen, jedoch ist die Länge nur minimal kürzer und die Anzahl der untersuchten Spender ( $n=2$ ) zu gering, um eine statistisch signifikante, biologisch relevante Aussage zu treffen.

Insgesamt zeigen die IGHV-Repertoire-Analysen der reifen CD5<sup>+</sup>, nicht jedoch der konventionellen naiven B-Lymphozyten aus Nabelschnurblut und adultem PB ein Bild das dem der murinen B-1a-Zellen sehr ähnlich ist: in neugeborenen Menschen sind diese Zellen restringiert in ihrem IGHV-Repertoire und weisen eine hohe Klonalität auf, diese Merkmale verlieren sich jedoch mit zunehmendem Alter.

## 4. Diskussion

Humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen weckten bereits vor vielen Jahren das Forschungsinteresse, da sie einen wesentlichen Anteil der PB B-Zellen im gesunden Menschen ausmachen und mit bestimmten Autoimmunerkrankungen und auch CLL in Verbindung gebracht wurden. Erste Studien zur Funktion dieser humanen CD5<sup>+</sup> B-Zellen wurden jedoch nicht der Tatsache gerecht, dass transitionelle B-Zellen ebenfalls CD5 ausprägen (Geiger et al., 2000; Sims et al., 2005), was die meisten Ergebnisse dieser frühen Arbeiten verzerrte und dazu führte, dass diese Population schnell wieder aus dem Forschungsfokus rückte. Erst kürzlich konnte eine Studie auf Grund von Ähnlichkeiten in Genausprägungsmustern und der Verwendung von sogenannten stereotypen BCR zeigen, dass reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen den zellulären Ursprung der CLL repräsentieren (Seifert et al., 2012). Dennoch fehlt bis heute ein fundiertes Verständnis dieser reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Menschen, ihrer Herkunft sowie ihrer immunologischen Funktionen im gesunden, menschlichen Immunsystem.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse humaner, reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen. Dabei stand das Verständnis ihrer immunologischen Funktionen, besonders der Vergleich mit murinen B-1a-Zellen, im Mittelpunkt. Zu diesem Zweck wurden CD5<sup>+</sup> B-Zellen des PB untersucht und molekular sowie funktionell charakterisiert. In weiteren Experimenten wurden diese Analysen auch auf CD5 ausprägende B-Zellen der menschlichen Bauchhöhle, des Nabelschnurbluts und auf B-Zellen aus humanisierten NSG-Mäusen ausgeweitet.

### 4.1. Humane, reife PB CD5<sup>+</sup> B-Zellen repräsentieren eine beständige, ruhende, homogene B-Zell-Population

Reife CD5<sup>+</sup> B-Lymphozyten ähneln, abgesehen von ihrer CD5-Ausprägung, sowohl phänotypisch als auch morphologisch sehr konventionellen naiven B-Zellen. Auch in publizierten Genausprägungsprofilen konnte die höchste Ähnlichkeit zwischen reifen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen unter den humanen Haupt-B-Zell-Populationen aus PB festgestellt werden (Seifert et al., 2012). In derselben Studie wurden ein unmutierter Ig- und *BCL6*-Lokus für diese Population beschrieben, was wiederum auf eine fehlende Keimzentrumserfahrung hindeutet (Seifert et al., 2012). Aus diesem Grund

wurden in dieser Arbeit konventionelle naive B-Zellen als Vergleichspopulation genutzt, um die wesentlichen Besonderheiten der CD5<sup>+</sup> B-Zellen möglichst präzise identifizieren zu können.

Bevor eine funktionelle Analyse erfolgen konnte, sollte mittels einer phänotypischen Charakterisierung beurteilt werden, ob es sich bei reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen um eine heterogene Mischung aus verschiedenen B-Zell-Populationen mit unterschiedlichen Aktivierungsstadien handelt. Entgegen früherer Publikationen (Werner-Favre et al., 1989) konnte eine CD5-Ausprägung als Aktivierungsmarker in den vorliegenden Analysen nicht bestätigt werden. Weder zeigten naive B-Zellen nach Aktivierung *in vitro* eine CD5-Ausprägung, noch konnten erhöhte Level an bekannten Aktivierungsmarkern (CD25, CD69, CD80) auf frisch isolierten CD5<sup>+</sup> B-Zellen detektiert werden (Abb. 5). Wichtige Kontrolle war hierbei, dass sich *in vitro* eine Aktivierung im gleichen Maß wie bei naiven B-Zellen induzieren ließ, d.h. es liegen bei CD5<sup>+</sup> B-Zellen keine Aktivierungszustände vor, die mit Ausprägung der klassischen B-Zell-Aktivierungsmarker einhergehen. Darüber hinaus zeigen reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen ein ruhendes, nicht proliferierendes Erscheinungsbild (siehe unten), differenzieren ohne Stimulierung nicht zu Plasmablasten oder Plasmazellen aus (siehe unten) und zeigen darüber hinaus keine typischen Genexpressionsmuster, die mit B-Zell-Aktivierung einhergehen (z.B. NFκB-Signaturen, nicht gezeigt). Demnach handelt es sich bei reifen PB CD5<sup>+</sup> B-Zellen nicht um eine aktivierte B-Zell-Population.

Weiterhin verweist die Stabilität der Oberflächenausprägung von CD5 auf reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen *in vitro* und eine fehlende Induzierbarkeit von CD5 auf konventionellen, naiven B-Zellen (Abb. 6) auf eine stabile, reife CD5<sup>+</sup> B-Zell-Population und widerspricht der Hypothese, CD5 sei ein induzierbares Molekül und bezeichnet keine distinkte Population (Werner-Favre et al., 1989).

Schließlich wurde in dieser Arbeit eine große Bandbreite von intra- und extrazellulären Molekülen auf naiven und reifen CD5 ausprägenden B-Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert; Beispiele dafür sind den Abb. 3A bis 3D zu entnehmen. Mit Ausnahme von CD43 (siehe unten) zeigte keines der analysierten Moleküle in diesen Untersuchungen eine heterogene, z.B. biphasische Ausprägung, die Rückschlüsse auf eine heterogene, reife CD5<sup>+</sup> B-Zell-Population zugelassen hätte. Eine fundierte Analyse zur Homo- oder Heterogenität dieser interessanten B-Zellen, die u.U. auch eine sehr kleine Subpopulation aufdecken könnte, wäre z.B.



eine Transkriptomanalyse (RNA-Sequenzierung, siehe Ausblick) auf Einzelzellebene, dies ist in dieser Arbeit jedoch nicht erfolgt.

#### **4.2. Humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen weisen Eigenschaften von murinen B-1a-Zellen auf**

Das CD5-Molekül ist zwischen mehreren Spezies, darunter Mensch und Maus, konserviert. Besonders der zytoplasmatische Anteil ist stark konserviert, was auf eine identische Funktion in den Spezies hinweist (Huang et al., 1987). Die Funktionen von murinen B-1a-Zellen sind gut charakterisiert und werden unter anderem durch die Ausprägung von CD5 unterstützt (Hebung der Aktivierungsschwelle von poly-/ autoreaktiven Lymphozyten) (Berland et al., 2002). Die Funktion von humanen, reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen ist dagegen unzureichend untersucht. Eine offene Frage war, ob die Gemeinsamkeit der CD5-Ausprägung einen Hinweis auf eine ähnliche zelluläre Funktion gibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen auf ihre Vergleichbarkeit zu murinen B-1a-Zellen getestet. Kriterien für das humane B-1a-Zell-Pendant wären für B-1a-Zellen typische Eigenschaften wie eine ontologisch frühe Entstehung, spontane Sekretion von „natürlichem“ IgM, Oligoklonalität, einem verzerrten IGHV-Nutzungsmuster (besonders in frühen Lebensjahren) sowie einer effizienten Beteiligung an TI-Immunreaktionen.

Die Frage nach einer humanen B-Zellpopulation, mit Eigenschaften der murinen B-1a-Zellen, besteht seit langem. CD5<sup>+</sup> B-Zellen wurden bereits früh als humanes Äquivalent vorgeschlagen, jedoch existieren bis heute keine fundierten Studien, die diese Theorie belegen. Eine ontogenetisch frühe Entstehung in der fötalen Leber sowie häufige Auto- und Polyreaktivität ihrer BCR wurde bereits beschrieben. Auch wurden CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der humanen Bauchhöhle gefunden (Nisitani et al., 1997). Jedoch wurden in diesen Studien unreife, ebenfalls CD5-ausprägende B-Zellen nicht ausgeschlossen. Weitere Studien unter der Leitung von T. Rothstein untersuchten eine Population mit dem Phänotyp CD20<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD70<sup>-</sup> im PB und Nabelschnurblut und schlugen diese als humanen Gegenspieler zu B-1a-Zellen vor, da diese drei B-1a-typische Eigenschaften aufwiesen: IgM-Sekretion, tonische, intrazelluläre Signalweiterleitung und die Fähigkeit T-Zellen stimulieren zu können (Griffin et al., 2011). Allerdings wurden diese Untersuchungen in Frage gestellt und es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser kleinen Population zu einem großen Teil um Plasmablasten handelt (Covens, Verbinen, Geukens, et al., 2013;

Covens, Verbinen, Jacquemin, et al., 2013; Descatoire et al., 2011; Perez-Andres et al., 2011; Tangye, 2013). Es ist wichtig festzuhalten, dass in allen Experimenten der vorliegenden Arbeit  $CD20^+CD43^+CD27^+$  B-Zellen von der Analyse ausgeschlossen wurden, da reife  $CD5^+$  B-Zellen als  $CD27^-$  definiert wurden. Hingegen konnte ein sehr geringer Anteil von ca. 5%  $CD43^+CD27^-$  B-Zellen unter reifen  $CD5^+$  B-Zellen identifiziert werden, welche nicht von den Analysen ausgeschlossen wurden. Vermutlich handelt es sich bei diesen  $CD43$  ausprägenden  $CD5^+$  B-Zellen um aktivierte Zellen, die auf dem Wege zur Plasmazell-Entwicklung den für Plasmablasten charakteristischen Marker  $CD43$  hochregulieren. Entsprechende Untersuchungen wurden in dieser Arbeit jedoch nicht getätigt. Klärung könnte auch hier z.B. eine Einzelzellanalyse liefern (siehe Ausblick).

Als erste Parallele zu murinen B-1a-Zellen konnten wir feststellen, dass humane, reife  $CD5^+$  B-Zellen neben ihrer  $CD5$ -Ausprägung ebenfalls eine stärkere IgM-Ausprägung gegenüber naiven B-Zellen aufweisen (Abb. 4) und in Cytospin-Analysen morphologisch etwas mehr Zytoplasma aufweisen (nicht gezeigt).

#### **4.2.1. Reife $CD5^+$ B-Zellen sezernieren IgM**

Eine maßgebliche Eigenschaft muriner B-1a-Zellen ist die Sekretion von „natürlichem IgM“ (Hardy et al., 1994). Sie sorgen für einen konstanten IgM-Titer im Serum (Baumgarth et al., 1999). Dazu benötigen die Zellen keine körperfremden Stimuli (wichtig: sehr wahrscheinlich jedoch alternative Stimulierung) und keine T-Zell-Hilfe (Martin et al., 2000). Neugeborene sind vielen unbekannten Pathogenen ausgesetzt, besitzen jedoch noch kein ausgereiftes TCR-Repertoire (Raaphorst et al., 1994) und sehr wahrscheinlich zu wenige  $T_H2$ -Zellen, um in typischen  $T_H2$ -Immunantworten hoch spezifische Antikörper herzustellen (Gibbons et al., 2014). Somit dient das konstant und Antigen unabhängig sezernierte IgM als erster, humoraler Abwehrmechanismus in Neugeborenen.

In ELISpot-Assays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass humane, reife  $CD5^+$  B-Zellen ebenfalls IgM sezernieren ohne zusätzlich stimuliert zu werden. Diese Aussage muss allerdings kritisch betrachtet werden, da die Membranen der ELISpot-Assays mit Antikörpern gegen IgM überzogen sind und somit sehr wahrscheinlich eine gewisse Stimulierung der BCR bewirken. In der Tat handelt es sich bei der Vergleichspopulation, den naiven B-Zellen, um ruhende Zellen, die ohne

ausreichende Aktivierung kein IgM sezernieren sollten. Als Hinweis auf eine Stimulierungswirkung der Membranen zeigt ein geringer Teil der naiven B-Zellen ebenfalls eine Sekretion von IgM. Ebenso muss bedacht werden, dass die B-Zellen für dieses Experiment sortiert wurden und die Inkubation mit den nötigen fluoreszierenden Antikörpern ebenfalls einen gewissen stimulierenden Einfluss haben kann. Zwar gilt diese Aktivierung für beide Populationen, d.h. differentielle Effekte sollten, wenn messbar, real sein, jedoch wird z.B. das CD5-Molekül nur auf den reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen berührt. Zu diesem letzten Fall ist jedoch zu sagen, dass eine Bindung von CD5 vor allem einen inhibierenden Effekt auf Lymphozyten hat (Bikah et al., 1996), einen Effekt den wir ebenfalls in unseren Langzeitstudien der Überlebensfähigkeit von naiven und reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen bemerken konnten (siehe unten). In mehreren Experimenten wurde eine aufwändige „untouched“ Isolierung der B-Zell-Populationen vorgenommen, diese zeigte in der Tat einen leicht höheren Aktivierungsschwellenwert beider Populationen, zeigte jedoch in allen Analysen die gleichen funktionellen Unterschiede zwischen naiven und reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen.

Für die ELISpot-Assays wurden außerdem Kontrollen mit fixierten B-Zellen angelegt, um zu überprüfen, ob auch diese nicht-sezernierenden Zellen Spots generieren. Diese, sowie Leerkontrollen ohne Zellen, ergaben keine Spots. Damit ist das Assay spezifisch für sezerniertes IgM. Im Vergleich sezernierten 2-10-fach mehr CD5<sup>+</sup> B-Zellen als naive B-Zellen IgM. Somit schließen wir aus unseren Untersuchungen, dass humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen – genau wie murine B-1a-Zellen auch – einer niedrigen (möglicherweise Antigen-unabhängigen) Stimulierung bedürfen, um „spontan“ natürliches IgM zu sezernieren.

#### **4.2.2. Reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen reagieren präferenziell auf TI-simulierte Stimulation**

Die Sekretion von natürlichem IgM durch B-1a-Zellen bedarf keiner T-Zell-Hilfe (Baumgarth et al., 2000). Es wird sogar diskutiert, dass keine körperfremden Strukturen nötig sind, um B-1a-Zellen zur Sekretion zu animieren. Dennoch lassen sich B-1a-Zellen durch verschiedene Stimuli aktivieren.

BCR-unabhängige Stimuli wie IL-5, IL-10 oder TLR-Agonisten führen bei B-1a-Zellen zur Delokalisation aus der Bauchhöhle (Ansel et al., 2002; Ha et al., 2006) in regionale Lymphknoten, Milz, Darm (lamina propria) und Omentum, wo sie große Mengen IgM oder IgA sezernieren. Werden B-1a-Zellen durch ein Antigen, also

mittels des BCR, stimuliert, werden sie unfähig zu proliferieren (Morris et al., 1993). Außerdem sollen sie Apoptose einleiten (Bikah et al., 1996), obwohl andere Studien keine Unterschiede in der Überlebensfähigkeit feststellen konnten (Morris et al., 1993).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit überlebten reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen *in vitro* schlechter im Vergleich zu naiven B-Zellen. Im Gegensatz dazu überleben murine B-1a-Zellen länger *in vitro* im Vergleich zu B-2-Zellen (Holodick, Tumang, et al., 2009). Möglicherweise ist dies eine Besonderheit der „humanen CD5<sup>+</sup> B-1a-Zellen“, die vielleicht sehr empfindlich auf die Isolierungsmethode reagieren (z.B. die nachteilige CD5-Stimulierung während der Zellsortierung, Abb. 9) oder aber bestimmte Zytokine benötigen, die in Kultur menschlicher Zellen durch den Serumzusatz aus Rinden nicht ersetzt werden können, während die Serumzusätze für Mausezellen *in vitro* möglicherweise hinreichend homolog sind. Dieser Punkt kann in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Wichtig ist jedoch alleine die Tatsache, dass humane, reife CD5<sup>+</sup> und naive B-Zellen trotz ihrer überwiegenden Ähnlichkeiten sehr unterschiedlich reagieren.

Die Behandlung mit anti-IgM-Antikörpern (TI-2 simuliert) führte zu einem verbesserten Überleben, welches allerdings nicht das der naiven B-Zellen übertraf. Auch TD-simulierte Stimulation verhalf CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen gleichermaßen zu einem verbesserten Überleben. Lediglich TI-1-simulierte Stimulierung mittels des TLR-Agonisten CpG verbesserte das Überleben der CD5<sup>+</sup> B-Zellen über das der naiven B-Zellen hinaus. Proliferation konnte durch alle drei Stimuli ausgelöst werden, wobei nur TI-2-simulierte Bedingungen eine signifikant stärkere Zellteilung in CD5<sup>+</sup> B-Zellen gegenüber naiven B-Zellen bewirken konnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen eine TI-Stimulierung eine verminderte Fähigkeit auf BCR-induzierte Signale zu reagieren zur Folge hat.

Anders als es in einer Publikation über B-1a-Zellen suggeriert wurde (Bikah et al., 1996), reagieren humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen auf BCR-induzierte Stimulation nicht mit schlechterem Überleben oder fehlender Proliferation. Hierzu ist jedoch zu sagen, dass die beobachtete Apoptose der murinen B1a-Zellen in dieser Studie möglicherweise den vehementen (unphysiologischen) Stimulierungsbedingungen geschuldet war, andere Studien konnten ebenfalls keine Apoptose von B-1a-Zellen unter IgM-Stimulierung feststellen. Übereinstimmend mit Bikah et al., konnten wir zeigen, dass eine BCR-Stimulierung von reifen CD5<sup>+</sup>, jedoch nicht konventionellen naiven B-Zellen eine Sensibilisierung weg von BCR- und hin auf TI-1-

Signalweitergabe bewirkte. Darüber hinaus tragen reife  $CD5^+$  B-Zellen Moleküle, die eine Aktivierung durch T-Zellen über CD40-Signalvermittlung vermindern oder gar unmöglich machen kann (nicht gezeigt).

Zusammengefasst können humane, reife  $CD5^+$  B-Zellen generell auf Stimuli aller drei Kategorien mit verbessertem Überleben und Proliferation reagieren. Im Vergleich zu naiven B-Zellen wirken TI-1- und TI-2-simulierte Bedingungen auf  $CD5^+$  B-Zellen stärker, was eine weitere wichtige Parallele zu B-1a-Zellen darstellt.

#### **4.2.3. Reife $CD5^+$ B-Zellen aus adultem PB nutzen ein ähnliches BCR-Repertoire wie naive B-Zellen**

Das BCR-Repertoire einer B-Zell-Population kann Aufschluss über mögliche Antigenerkennung, Ursprung und Selektion der Population geben. In der Maus unterscheidet sich das BCR-Repertoire von B-1a- und B-2-Zellen, was durch die Genese der Zellen sowie spätere Selektionsvorgänge begründet ist. B-1a-Zellen werden im Embryo gebildet. Zu diesem Zeitpunkt wird TdT nicht ausgeprägt, was zum fehlenden Einbau von N-Nukleotiden führt. B-2-Zellen werden hingegen später generiert, wenn TdT den Einbau von N-Nukleotiden ermöglicht. Des Weiteren unterscheiden sich die Antikörper der Zelltypen durch die Nutzung verschiedener V-Gene. Während B-1a-Zellen V-Gene nutzen, welche proximal zum J gelegen sind, verwenden B-2-Zellen ein breiteres Spektrum an V-Genen, unabhängig der Lokalisation im Genom. Die von B-1a-Zellen umgelagerten und selektierten V-Gene sind zudem besonders in ihrer Antigenerkennung. Sie weisen eine breite Reaktivität (Polyreaktivität und Autoreaktivität) auf, welche die Erkennung von verschiedenen Erregern ermöglicht.

Die hier durchgeführte BCR-Repertoire-Analyse von humanen, reifen  $CD5^+$  B-Zellen (Set#2  $CD5^+CD23^+CD27^+IgD^+CD38^{low}$ ) aus gesunden Spendern ergab ein Repertoire ähnlich dem der Antigen-unerfahrenen, nicht GC-selektierten, naiven B-Zellen ( $CD5^+CD23^+CD27^+IgD^+CD38^{low}$ ) des jeweiligen Spenders. Unter  $CD5^+$  B-Zellen wurde jedoch VH4-34 signifikant häufiger verwendet als unter naiven B-Zellen. Dieses V-Gen-Segment vermittelt, unabhängig der dazugehörigen leichten Kette des Antikörpers, oft Autoreaktivität. VH4-34, früher als VH4-21 bezeichnet, ist in Autoimmunerkrankungen, wie SLE, sowie in AIDS und HCV-infizierten Patienten überpräsentiert und erkennt Kohlenhydrate (I/i RBC), welche in einer hohen Dichte auf Erythrozyten vorhanden sind (Borretzen et al., 1995). Autoreaktivität wurde

bereits für CD5<sup>+</sup> B-Zellen sowie für B-1a-Zellen beschrieben (Casali et al., 1987; Nakamura et al., 1988). Des Weiteren sind die V-Gene beider Populationen nicht somatisch mutiert, was durch fehlende Keimzentrumserfahrung (Phänotyp, *BCL6*-unmutiert, TI-Immunantworten) zu erklären ist.

Es konnte keine klonale Verwandtschaft innerhalb sowie zwischen den beiden Populationen festgestellt werden. Auch in den konsekutiven Proben, die denselben Spendern mit Abstand von je einem Jahr entnommen wurden, konnten keine verwandten Sequenzen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die geringen Unterschiede sind möglicherweise durch das Alter der Spender zu begründen. Auch in Mäusen ist bekannt, dass das BCR-Repertoire von B-1a-Zellen mit zunehmenden Alter der Mäuse sich dem der B-2-Zellen angleicht (Gu et al., 1990; Holodick, Repetny, et al., 2009). Entsprechend müsste das BCR-Repertoire aus Neugeborenen untersucht werden, um einen adäquaten Vergleich zu erhalten. Im Abschnitt 4.2.6 werden Daten zur Analyse des BCR-Repertoires aus humanem Nabelschnurblut diskutiert.

Die Reduktion der Mutationsfrequenz und Klonalität zwischen der ersten und zweiten Sortierstrategie der reifen CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen unterstreicht die Wichtigkeit der zusätzlichen Berücksichtigung der CD23-Ausprägung beider Populationen (Set#1 CD5<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> gegenüber Set#2 CD5<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>). Der Verdacht, es befänden sich GC-erfahrene B-Zellen unter ersterer Sortierung, konnte durch die Analyse von CD5<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup> B-Zellen bestätigt werden. Diese Populationen wiesen erhöhte Mutationsfrequenzen sowie Klonalitäten der Sequenzen auf und wurden durch die verbesserte Sortierstrategie (Set#2) ausgeschlossen.

#### 4.2.3.1. Bewertung der Methode zur Bestimmung des BCR-Repertoires

Eine wichtige Aufgabe dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zu einer massiven, parallelen Tiefensequenzierung von umgelagerten IGHV-Genen innerhalb einer ausgewählten B-Zell-Population. Dieses Verfahren sollte IGHV-Gene aus einer großen Anzahl an Zelläquivalenten bestimmen können. Kriterien waren eine quantitative Auswertbarkeit von IGHV-Sequenzen mit IGHV-Nutzung, Mutationsfrequenz und Klonalität der Zellen. Dazu sollten Sequenzen aus verschiedenen Ursprungszellen von PCR-erzeugten Replikaten unterschieden werden können. Analog zu Kinde et al., 2011 wurden hierzu UMI in die erste Kopie des

umgelagerten V-Gens eingefügt und bei weiteren PCR-Zyklen mit amplifiziert. Diese 12-Nukleotid-langen UMI haben den Vorteil identische Sequenzen Replikaten oder einzelnen Ursprungzellen zuordnen zu können, späte PCR-Fehler zu reduzieren (und damit von echten Mutationen unterscheiden zu können) und Sequenzierer-induzierte Fehler ebenfalls weitestgehend eliminieren zu können.

Die Bewertung der Methode wurde anhand der Sequenzierung von Set#2 (PB CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> und CD5<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) durchgeführt. Die eingesetzte Menge an genomischer DNA entsprach je 30.000 Zellen und die prozessierten Doppelansätze wurden vereinigt, sodass je 60.000 Zellen pro Bedingung in die Analysen eingingen. Die Anzahl der Sequenzen nach Zusammenlegung identischer Sequenzen (gleicher UMI und Sequenz) betrug zwischen 10.400 und 23.600. Da nur solche Sequenzen, die V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>3 oder V<sub>H</sub>4 nutzten, amplifiziert wurden, wurden ca. 90% der möglichen umgelagerten IGHV-Gene in die Analyse eingeschlossen. Somit entsprechen die Anzahlen der analysierten Sequenzen weniger als einem Drittel der zu erwartenden Zelläquivalente (Je Zelle werden eine Umlagerungen und für ein weiteres Drittel der Zellen eine zweite Umlagerung gerechnet, da dieser Anteil der B-Zellen neben dem umgelagerten, produktiven V<sub>H</sub>-Gen ebenfalls ein umgelagertes, unproduktives V<sub>H</sub>-Gen besitzt). Diese Differenz kommt wahrscheinlich durch technische Gründe zustande. Ein Teil der genomischen DNA geht bei der DNA-Extraktion verloren. Zudem ist die PCR vermutlich diesbezüglich ineffizient, da nur solche Abschnitte weiter vervielfältigt werden, die in den ersten beiden PCR-Zyklen vollständig kopiert wurden. V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4-Segmente waren zu erwartenden Anteilen vorhanden, sodass das Primergemisch die Amplifikation aller drei V<sub>H</sub>-Familien ermöglichte.

UMI sollen besonders bei der Identifikation von klonal verwandten Sequenzen helfen, indem sie solche von Amplikons einer Ursprungszelle abgrenzen. Beim Vergleich von identischen Sequenzen mit unterschiedlichen UMI (Definition für klonal verwandte Sequenzen) innerhalb eines Reaktionsansatzes und zwischen zwei Ansätzen (A und B), konnten allerdings große Unterschiede festgestellt werden. Während die Anzahl der „Klone“ innerhalb eines Ansatzes beträchtlich war, konnten keine oder kaum Klone zwischen zwei Ansätzen gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Als Kontrollpopulation dienten Antigen-erfahrene, häufig klonal expandierte Gedächtnis-B-Zellen. Diese wiesen einen zu erwartenden Anteil an Klonen zwischen zwei Ansätzen auf. Dieser Befund, dass klonale Expansionen vor allem innerhalb und kaum zwischen biologischen Replikaten aufzufinden sind, könnte auf einen nicht

korrekten Einbau der UMI innerhalb eines Reaktionsansatzes hindeuten. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da überzählige Primer (mit zusätzlichen UMIs) nach den ersten beiden Zyklen effizient verdaut wurden (Dies wurde kontrolliert durch weitere PCR-Zyklen ohne zusätzliche Primer ab Zyklus 3). Sehr viel wahrscheinlicher ist dagegen das Problem der sogenannten Hybrid-Artefakte, einem klassischen PCR-Problem, bei dem unvollständig prozessierte Amplifikate in nachfolgenden Zyklen als Primer für ähnliche Templates wirken können. Dieser Nebeneffekt kann nicht behoben werden. Es ist wichtig festzuhalten, dass das Problem der Hybridartefakte praktisch nur die Klonalität von Sequenzen derselben PCR-Reaktion verzerrt; dieses Problem konnte durch das experimentelle Design, das die parallele Amplifikation von zwei Replikaten vorsah, aufgefangen werden.

Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit Klone als solche gezählt, die in beiden Reaktionsansätzen vorkommen. Damit wird die tatsächliche Klonanzahl und -größe vermutlich unterschätzt, aber keinesfalls überschätzt. Ein Vorteil, der bestehen bleibt, ist die Möglichkeit anhand der UMI identische Sequenzen einer Ursprungszelle zusammenzufügen und dabei späte PCR- und Sequenzierfehler zu erkennen und zu korrigieren. Auch die Quantifizierung der Zelläquivalente ist durch die PCR nach wie vor relativ genau, da die Generierung „neuer“ Sequenzen als Hybride mehrere Templates Größenordnungen unter der tatsächlichen Zellzahl liegt und nur einen minimalen Einfluss auf die Zählung von IGHV-Gen-Umlagerungen etc. nimmt.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit eine Methode zur quantitativen Tiefensequenzierung humaner IGHV-Gene etabliert, die sehr effizient und zuverlässig ist und für eine große Zahl weiterer Anwendungen zur Verfügung steht.

#### **4.2.4. In der humanen Bauchhöhle befinden sich CD5<sup>+</sup> B-Zellen**

In der Maus befinden sich B-1a-Zellen hauptsächlich in der Bauchhöhle, weniger in der Milz und im PB, wobei B-2-Zellen vermehrt in der Milz und in PB angesiedelt sind. Im Menschen wurden keine oder nur wenige CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der Bauchhöhle gesunder Spender gefunden (Nisitani et al., 1997). Die hier untersuchten Proben der Peritoneallavagen aus gesunden Spenderinnen hingegen wiesen zwar zumeist niedrige Gesamt-B-Lymphozytenzahlen auf, deren Gehalt an CD5<sup>+</sup> B-Zellen war jedoch überraschend hoch, zumeist höher als im PB gleichaltriger Spender. Der Großteil dieser CD5<sup>+</sup> B-Zellen trug typische Marker reifer, Antigen-unerfahrener B-Zellen. Ein geringerer Teil prägte CD27 aus. Das BCR-Repertoire von sortierten



CD5<sup>+</sup> und naiven B-Zellen wies keine signifikanten Unterschiede oder Auffälligkeiten auf. Eine funktionelle Charakterisierung dieser peritonealen B-Zellen ist auf Grund der seltenen Proben und niedrigen Zellzahlen praktisch unmöglich, sehr interessant dagegen wäre jedoch eine umfassendere Charakterisierung dieser besonders lokalisierten B-Zellen z.B. über Transkriptomanalysen (siehe Ausblick), etwa um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser peritonealen B-Zellen mit PB B-Zellen vergleichen zu können.

#### **4.2.5. Die Anzahl der reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen nimmt mit dem Alter ab**

Die Korrelation des relativen Anteils CD5<sup>+</sup> B-Zellen zu Gesamt-B-Zellen im Blut mit dem Spenderalter im gesunden Menschen zeigte einen deutlichen Abfall mit steigendem Alter. Diese Abnahme an reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen war bis zum 35. Lebensjahr besonders deutlich. In dieser Arbeit kann keine Aussage über absolute Zellezahlen getroffen werden, da nur relative Werte gemessen wurden und keine Zellzahlbestimmung stattgefunden hat.

Diese Feststellung des reduzierten Anteils an reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen deckt sich mit der Erkenntnis, dass auch in der Maus B-1a-Zellen bereits wenige Wochen nach der Geburt deutlich in ihrer Anzahl sinken. Sie spiegelt sich ebenso in der Reduktion von „natürlichem“ Serum-IgM wider. Es wird vermutet, dass die Vorläuferzellen zu diesem frühen Zeitpunkt an Potential verlieren, B-1a-Zellen generieren zu können (Barber et al., 2011). In der Maus lässt sich damit möglicherweise das Risiko mit höherem Alter, durch z.B. Pneumokokken zu erkranken, erklären, was möglicherweise auch im Menschen eine Rolle spielen könnte. Der Einfluss reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen auf altersabhängige Immunität wäre daher ein interessantes Forschungsvorhaben. Auch in diesem Fall sind humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen den murinen B-1a-Zellen ähnlich.

#### **4.2.6. CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus Nabelschnurblut weisen klonale Expansionen auf**

Die Analysen des BCR-Repertoires von reifen B-Zellen (CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>low</sup>IgD<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>low</sup>IgD<sup>+</sup>) aus Nabelschnurblut erbrachten für beide Populationen einen leicht erhöhten Mutationsstatus gegenüber naiven B-Zellen aus PB, dennoch bleibt festzuhalten, dass die große Mehrheit der B-Zellen somatisch unmutiert ist. Die wenigen Mutationen pro Genumlagerung, die detektiert

wurden, sind wahrscheinlich ohne biologische Bedeutung sondern eher technischen Ursprungs. Auffällig war die höhere Klonalität unter CD5<sup>+</sup> B-Zellen gegenüber den CD5<sup>-</sup> B-Zellen aus Nabelschnurblut desselben Spenders sowie gegenüber den antigen-unerfahrenen B-Zellen des PB, ein weiteres Merkmal, das auch in murinen B-1a-B-Zellen zu beobachten ist.

Interessanterweise besitzen B-Zellen des Nabelschnurblutes, besonders reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen, kürzere CDRIII im Vergleich zu naiven B-Zellen des PB, ein weiteres Charakteristikum von *de novo* generierten B-1a-Zellen.

In gealterten Mäusen nimmt nicht nur die Anzahl der B-1a-Zellen ab. Außerdem verlieren B-1a-Zellen bestimmte typische Eigenschaften, darunter auch das Fehlen von N-Nukleotiden. So konnten nur bei etwa einem Drittel der B-1a-Zellen aus adulten Mäusen N-Nukleotide festgestellt werden (Kantor et al., 1997). Damit wird auch relativiert, dass im erwachsenen Menschen reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen längere CDRIII besitzen als solche aus Nabelschnurblut. Ob es sich dabei tatsächlich um eine geringere Anzahl an N-Nukleotiden handelt, bleibt in weiteren Analysen festzustellen. Auch B-1a-Vorläufer aus fötaler Leber und Knochenmark generieren B-1a-Zellen mit N-Nukleotiden, d.h. TdT ist nicht grundsätzlich nicht exprimiert sondern wahrscheinlich weniger aktiv.

Wenn die geplanten nachfolgenden Spender eine vergleichbare Tendenz aufweisen wie die bisher analysierten Spender, dann könnte es sich lohnen, in den IGHV-Gen-Umlagerungen gezielt N-Nukleotide zu quantifizieren um festzustellen, wie hoch auch in diesem Aspekt die Ähnlichkeit von humanen, reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus Nabelschnurblut und murinen B-1a-Zellen ist. Bislang stellt die vorliegende Analyse zumindest keinen Widerspruch dar, sondern zeigt eine Tendenz zur Ähnlichkeit beider Populationen.

#### **4.2.7. HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut können reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen in NSG-Mäusen generieren**

B-1a-Zellen werden ontogenetisch früh bereits in der fötalen Leber der Maus generiert. Die Fähigkeit B-1a-Zellen *de novo* generieren zu können sinkt mit dem Alter. Bereits mit dem Zeitpunkt der Geburt ist dieses Potential deutlich reduziert (Barber et al., 2011). Transferstudien haben gezeigt, dass HSC/Vorläuferzellen des Knochenmarks einer adulten Maus B-2 und MZB, aber keine B-1a-Zellen, hervorbringen. Werden hingegen fötale Leberzellen transferiert, entstehen B-1a-

Zellen, aber keine B-2-Zellen, was für einen Ursprung der Linien in unterschiedlichen HSC oder Vorläuferzellen spricht (Ghosn et al., 2012).

Analog dazu wurden hier humane HSC/Vorläuferzellen unterschiedlichen Ursprungs in NSG-Mäuse transferiert. CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen (gesamt CD34<sup>+</sup> sowie MPPs oder LMPPs) aus humanem Nabelschnurblut generierten reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen, welche in der Milz, aber auch in der murinen Bauchhöhle, zu finden waren. Zwar konnten reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen auch in Mäusen identifiziert werden, die CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen aus Knochenmark oder mobilisiert aus PB von erwachsenen Spendern erhalten haben, jedoch konnten diese nicht in der Bauchhöhle gefunden werden. Außerdem war die Effizienz reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen generieren zu können in letzten beiden Fällen deutlich vermindert.

Auffällig war, dass beinahe alle B-Zellen die in den humanisierten Mäusen aufgefunden wurden, CD5 ausprägen, das stimmt auch überein mit bisherigen Publikationen. BAFF wird in Mäusen und Menschen von myeloiden Zellen und einem bislang uncharakterisierten Zelltyp im Knochenmark der Maus gebildet (Gavin et al., 2003; Gross et al., 2001; Mackay et al., 2010). Da humanisierte NSG-Mäuse normale Zahlen an murinen myeloiden Zellen und nur sehr wenige humane myeloide Zellen bilden, ist davon auszugehen, dass in den humanisierten Mäusen vor allem murines BAFF vorliegt. Murines BAFF kann humane Rezeptoren nicht stimulieren. Weiterhin ist bekannt, dass B-2-, nicht jedoch B-1-B-Zellen BAFF zum Überleben in der Peripherie benötigen, obwohl beide Zelltypen die notwendigen Rezeptoren für BAFF besitzen (Rolink et al., 2002). Daher schließen wir daraus, dass humanisierte Mäuse vor allem humane B-1a-B-Zellen, d.h. reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen, und nicht konventionelle naive B-Zellen ausbilden können. Auch dies ist ein wichtiger Punkt, da hier wiederum ein funktioneller Unterschied zwischen reifen CD5<sup>+</sup> und konventionellen naiven B-Zellen bemerkbar wird. Darüber hinaus zeigt es eine weitere interessante (bislang theoretische) Parallele zwischen humanen CD5<sup>+</sup> B-Zellen und murinen B-1a-Zellen. Ob BAFF nur die Überlebensfähigkeit humaner naiver B-Zellen, nicht jedoch reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen erhöht, wurde nicht getestet, da nicht auszuschließen ist, dass humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die den BAFF-Rezeptor ja tragen, durchaus auf BAFF reagieren können, dieser Stimulierung aber vielleicht einfach nicht bedürfen.

Von je einer Maus, die mit CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen aus Knochenmark oder Apherese rekonstituiert wurde, und von zwei Mäusen, die mit CD34<sup>+</sup> HSC/Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut rekonstituiert wurden, wurde das IGHV-Repertoire mittels Klonierung von umgelagerten V<sub>H</sub>1-, V<sub>H</sub>3-, und V<sub>H</sub>4-V-Genen

untersucht. Auffällig war die häufige Nutzung von IGHV4-34 in reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen unabhängig des Ursprungs der HSC/Vorläuferzellen, wiederum eine spannende Parallele zu den reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB und Nabelschnurblut gesunder Spender (siehe oben), die erstens für eine Verwandtschaft dieser Lymphozyten spricht und zweitens auch für den Einfluss von Autoreaktivität auf die Entstehung oder Selektion reifer humaner CD5<sup>+</sup> B-Zellen spricht, ähnlich der murinen Situation. Eine exakte Analyse der Spezifität humaner CD5<sup>+</sup> B-Zellen ist in dieser Arbeit nicht erfolgt, frühere Publikationen argumentieren ebenfalls für einen Teil von Auto-/Polyreaktivität in reifen humanen CD5<sup>+</sup> B-Zellen (die jedoch auch in dieser Studie nicht von transitionellen B-Zellen separiert wurden).

Interessanterweise konnte in ELISA-Assays eine IgM-Sekretion reifer CD5<sup>+</sup> B-Zellen ohne Stimulierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zusammengenommen ähneln die durch juvenile HSC/Vorläuferzellen generierten reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen B-1a-Zellen, indem sie in größeren Zahlen generiert wurde als von adulten HSC/Vorläuferzellen, sie in der Bauchhöhle der Maus vorzufinden sind, für Autoreaktivität bekannte V<sub>H</sub>-Genen in ihren BCR nutzen und zudem (spontan) IgM sezernieren.

In diesem Modell kann nicht geklärt werden, ob die Effizienz reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen generieren zu können im Alter der HSC/Vorläuferzellen bedingt ist oder die Zusammensetzung der HSC/Vorläuferzellen oder Typen unterschiedlich ist. Durchflusszytometrische Analysen vor Zelltransfer durch André Goergens (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen) ergaben kein signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung, welche auf ein unterschiedliches Potential hinweisen könnten, verschiedene B-Zelllinien generieren zu können.

Es herrscht das Paradigma, dass sich aus einer einzelnen HSC alle Zellen des hämatopoetischen Systems entwickeln können (Osawa et al., 1996). Jedoch wurde gezeigt, dass einzelne HSC aus adultem Knochenmark keine B-1a-Zellen hervorbringen (Ghosn et al., 2016). Jedoch hat sich für B-1a-Zellen die Vermutung erhärtet, dass unterschiedliche Vorläufer für die Entstehung der beiden Linien verantwortlich sind. Entsprechend wird spekuliert, dass sich die Arten der Vorläuferzellen in der fötalen Leber von denen im adulten Knochenmark unterscheiden (Ghosn et al., 2016).

Zusammengefasst hat auch die Analyse humanisierter Mäuse starke Argumente für die Hypothese geliefert, dass humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen das menschliche Pendant zu murinen B-1a-Zellen darstellen und suggeriert, dass humanisierte Mäuse ein

gutes Modell für die Erforschung humaner B-1a-B-Zellen (und nicht konventionelle B-Zellen) darstellen. Dieser Punkt, gemeinsam mit dem Befund, dass B-1a-B-Zellen wie reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen nur schlecht an TD Immunantworten teilnehmen, könnte erklären, warum diese humanisierten Mäuse so schlecht TD immunisierbar sind.

#### **4.3. Zusammenfassender Vergleich von humanen, reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen und murinen B-1a-Zellen**

Nimmt man die Erkenntnisse aus dieser Arbeit zu humanen, reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus PB sowie der Bauchhöhle, der Nabelschnur und den B-Zellen aus humanisierten Mäusen zusammen, lassen sich folgende Aussagen treffen.

Humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen unterscheiden sich von konventionellen naiven B-Zellen in folgenden Aspekten:

Sie reagieren unterschiedlich auf TD- und TI-simulierte Stimulationsbedingungen, sind wesentlich effizienter in TI-Immunantworten und verfügen über molekulare Mechanismen, TD-Immunantworten zu vermeiden.

Sie verfügen über ein schnelles und effizientes Differenzierungspotential, sezernieren schneller und effizienter IgM als naive B-Zellen unter polyklonaler Stimulierung, d.h. sie können einen natürlichen Antikörpertiter generieren (siehe auch die IgM-Titer in humanisierten Mäusen).

Sie sind ontogenetisch früh angelegt und ihre Zahl nimmt mit dem Alter ab.

In dieser Arbeit zu reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen sind auch Unterschiede zu murinen B-1a-Zellen aufgefallen, etwa die Überlebensfähigkeit *in vitro*, ein weniger verzerrtes IGHV-Repertoire und mehr N-Nukleotide. Diese Unterschiede können jedoch alle damit erklärt werden, dass humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen adulten Menschen entnommen wurden, die sich sehr deutlich in der Lebenserwartung, der Genetik (z.B. dem Aufbau des Ig-Lokus), den immunologischen Anforderungen und nicht zuletzt der Komplexität des Immunsystems von Inzucht-Labormäusen unterscheiden. Daher erscheint es nicht verwunderlich, dass sich auch das humane B-1a-Zell-Pendant von seinem murinen Gegenstück unterscheidet. Weiterhin muss man bedenken, dass drastische Experimente wie z.B. Zelltransferexperimente, die nur in Mäusen möglich waren und zu besonderen Ergebnissen geführt haben, möglicherweise auch zu etwas verzerrten Erkenntnissen geführt haben, da sie schließlich in ihrer Durchführung ebenfalls höchst unphysiologisch waren. Z.B. beruht das Paradigma

der spontanen IgM-Sezernierung auf nicht immunisierten Mäusen, ungeachtet der Tatsache, dass diese Mäuse durchaus z.B. Futterantigene erhielten und trotz keimfreier Haltung eine Darmflora aufweisen. D.h. auch in Mäusen mag eine Stimulierung zur Sezernierung vorliegen, die jedoch so nicht beschrieben wurde.

Ebenfalls muss beachtet werden, dass in unseren Experimenten fast keine Methode oder kein Messpunkt einen idealen Vergleich zu den jeweiligen Mausexperimenten darstellt. Daher können durchaus auch technische Varianz und unterschiedliches Alter zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Z.B. ist bekannt, dass murine B-1a-Zellen zunächst ein BCR-Repertoire ausprägen, welches sich von dem von B-2-Zellen unterscheidet indem mehr J<sub>H</sub>-proximal gelegene V<sub>H</sub>-Gen-Segmente bei der V-Gen-Umlagerung verwendet und weniger bis keine N-Nukleotide eingefügt werden. Mit dem Alter jedoch verringert sich der Anteil an B-1a-Zellen, die solche Keimbahn-ähnliche BCR ausprägen, deutlich. Eine größere Bandbreite an V-Genen werden genutzt und mehr N-Nukleotide werden eingefügt (Gu et al., 1990; Holodick, Repetny, et al., 2009). Es wird diskutiert, dass B-1a-Vorläuferzellen bereits wenige Wochen nach der Geburt der Maus das Potential verlieren B-1a-Zellen zu generieren, die das volle Repertoire an aufgeführten, typischen Eigenschaften besitzen (Barber et al., 2011).

Als abschließender Punkt soll die hauptsächliche maligne Erkrankung der reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die Chronische Lymphatische Leukämie genannt werden. Bereits früh wurden CD5 B-Zellen als ihr zellulärer Ursprung vorgeschlagen, konnten in nachfolgenden Experimenten (aus oben genannten Gründen) jedoch zunächst nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war mehrfach bemerkt worden, dass CLL eine ganze Reihe an B-1a-Zell-Charakteristika aufwies, diese jedoch eines gültigen humanen Gegenstücks entbehrten und daher wieder verworfen wurden. Die vorliegende Arbeit dient daher nicht zuletzt dazu, diesen vermeintlichen Widerspruch aufzuklären und bietet eine simple Lösung auch für den zellulären Ursprung der CLL: reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen sind das Gegenstück zur murinen B-1-Linie.

## 5. Zusammenfassung

Humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen standen bereits früher im Fokus der Forschung. Eine erhöhte Prävalenz wurde im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen beschrieben. Jedoch blieb die immunologische Funktion von humanen, reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen bislang ungeklärt. Aufgrund der Gemeinsamkeit der CD5-Ausprägung besteht die Vermutung humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen könnten funktionelle Ähnlichkeiten zu murinen B-1a-Zellen besitzen.

B-1a-Zellen werden ontogenetisch früh generiert und sezernieren ohne T-Zell-Hilfe zu benötigen IgM, welches ein breites Spektrum an pathogenen Strukturen erkennt. Somit sollen B-1a-Zellen einen ersten Schutz gegen eindringende Pathogene ermöglichen bis das ausgereifte adaptive Immunsystem hochspezifische Antworten generieren kann. In dieser Arbeit konnten einige Eigenschaften ebenfalls für humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen bestätigt werden. Es konnten die Fähigkeiten, wie z.B. IgM zu sezernieren und auf TI-simulierte Stimulierungsbedingungen reagieren zu können, aufgezeigt werden. Zudem konnten CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der humanen Bauchhöhle nachgewiesen werden.

In erwachsenen Menschen scheinen CD5<sup>+</sup> B-Zellen Funktionen ähnlich der konventionellen naiven B-Zellen ausführen zu können. Sie ähneln phänotypisch naiven B-Zellen, sind GC-unerfahren, sie reagieren auf TD-simulierte Stimuli und haben ein BCR-Repertoire ähnlich dem der naiven B-Zellen. Darüber hinaus allerdings lassen sie sich schnell zur IgM-Sekretion animieren ohne dabei T-Zell-Hilfe zu erfahren. Möglicherweise ist die eigentliche Funktion von humanen CD5<sup>+</sup> B-Zellen nicht mehr so stark ausgeprägt und ähnelt damit auch konventionellen B-Zellen. Auch für B-1a-Zellen ist bekannt, dass sie typische Eigenschaften verlieren oder weniger ausprägen. Z.B. gleicht sich das BCR-Repertoire, darunter die V-Gen-Nutzung sowie die Anzahl der N-Nukleotide, der B-1a-Zellen dem der B-2 Zellen mit dem Alter an. Es wird diskutiert, dass B-1a-Vorläuferzellen bereits wenige Wochen nach der Geburt der Maus das Potential verlieren B-1a-Zellen zu generieren, die das volle Repertoire an aufgeführten, typischen Eigenschaften besitzen.

Im BCR-Repertoire befinden sich in humanen sowie murinen CD5<sup>+</sup> B-Zellen BCR, die Selbstantigene erkennen. Die Ausprägung von CD5 setzt die Intensität des BCR-Signals herab und könnte damit eine Überstimulation in autoreaktiven B-Zellen verhindern und diese am Leben halten. Eine Hypothese besagt, dass solche Zellen

mit meist polyreaktivem BCR erhalten bleiben sollen, um auf Pathogene reagieren zu können.

Zusammengenommen liegt die Vermutung nahe, dass humane, reife  $CD5^+$  B-Zellen, zumindest im jungen Menschen, B-1a-Zellen entsprechen.



## 6. Ausblick

Haupteigenschaft der B-1a-Zellen konnten in dieser Arbeit für humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen beschrieben werden.

Z.B. konnte die Fähigkeit IgM zu sezernieren bestätigt werden. Natürliches IgM aus B-1a-Zellen weist oftmals eine breite Spezifität für mehrere Pathogene und Autoantigene auf (Poly- und Autoreaktivität). Weiterführende Analysen sollen die BCR-Spezifität von humanen CD5<sup>+</sup> B-Zellen untersuchen, um möglicherweise ähnliche Spezifitäten identifizieren zu können. Methodische Ansätze werden ELISA/ELISpot-Assays mit B-1a-Zell-spezifischen Antigenen einschließen.

Des Weiteren zeigten die IGHV-Analysen für B-Zellen des Nabelschnurblutes interessante Hinweise auf reduzierte Anzahlen an N-Nukleotiden gegenüber PB B-Zellen. Weitere Spender werden in solche Analysen eingehen, um einen genaueren Einblick zu erhalten.

Neben der spontanen Sekretion von natürlichem IgM sezernieren murine B-1a-Zellen ebenfalls IgA nach Plasmazell-Differenzierung im Darm der Mäuse. Analog soll untersucht werden, ob humanen, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen ebenfalls in der Lage sind nach Differenzierung IgA sezernieren zu können. Dazu sollen zunächst humanisierte Mausmodelle und anschließend Darmabschnitte aus Neugeborenen auf IgA-sezernierende Plasmazellen untersucht werden.

In einem weiteren Ansatz, der derzeit verfolgt wird, wird untersucht in wie fern humane, reife CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der Lage sind Einfluss auf Zellen des angeborenen Immunsystems zu nehmen. Es zeigten sich bereits Hinweise, dass Monozyten in Kokultur mit reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen eine veränderte Differenzierung durchlaufen.

Geplant sind außerdem Einzelzellanalysen (RNA-Sequenzierung) von CD5<sup>+</sup> B-Zellen, um weitergehende Informationen zu erhalten, in wie weit es sich tatsächlich um eine homogene Population handelt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ansel, K. M., Harris, R. B., & Cyster, J. G. (2002). CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*, 16(1), 67-76.
- Appleyard, G. D., & Wilkie, B. N. (1998). Porcine CD5 gene and gene product identified on the basis of inter-species conserved cytoplasmic domain sequences. *Vet Immunol Immunopathol*, 60(3-4), 275-283.
- Baker, J. E., Majeti, R., Tangye, S. G., & Weiss, A. (2001). Protein tyrosine phosphatase CD148-mediated inhibition of T-cell receptor signal transduction is associated with reduced LAT and phospholipase Cgamma1 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 21(7), 2393-2403.
- Barber, C. L., Montecino-Rodriguez, E., & Dorshkind, K. (2011). Reduced production of B-1-specified common lymphoid progenitors results in diminished potential of adult marrow to generate B-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33), 13700-13704.
- Baumgarth, N., Herman, O. C., Jager, G. C., Brown, L., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1999). Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 2250-2255.
- Baumgarth, N., Herman, O. C., Jager, G. C., Brown, L. E., Herzenberg, L. A., & Chen, J. (2000). B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med*, 192(2), 271-280.
- Berland, R., & Wortis, H. H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*, 20, 253-300.
- Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J. R., Tarakhovsky, A., & Bondada, S. (1996). CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science*, 274(5294), 1906-1909.
- Borretzen, M., Chapman, C., Stevenson, F. K., Natvig, J. B., & Thompson, K. M. (1995). Structural analysis of VH4-21 encoded human IgM allo- and autoantibodies against red blood cells. *Scand J Immunol*, 42(1), 90-97.
- Bos, N. A., Meeuwse, C. G., Westmann, B. S., Pleasants, J. R., & Benner, R. (1988). The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. *Cell Immunol*, 112(2), 371-380.
- Bräuninger, A., Küppers, R., Spieker, T., Siebert, R., Strickler, J. G., Schlegelberger, B., Rajewsky, K., & Hansmann, M. L. (1999). Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. *Blood*, 93(8), 2679-2687.
- Budeus, B., Schweigle de Reynoso, S., Przekopowicz, M., Hoffmann, D., Seifert, M., & Küppers, R. (2015). Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(38), E5281-5289.
- Caligaris Cappio, F., Novarino, A., Matera, L., & Gavosto, F. (1981). Cell surface markers and kinetic features in acute lymphoblastic leukaemia. *Haematologica*, 66(4), 419-425.

- Casali, P., Burastero, S. E., Nakamura, M., Inghirami, G., & Notkins, A. L. (1987). Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science*, 236(4797), 77-81.
- Charo, I. F., Myers, S. J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A. J., & Coughlin, S. R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(7), 2752-2756.
- Chevallier, N., Berthelemy, M., Laine, V., Le Rhun, D., Femenia, F., Polack, B., Naessens, J., Levy, D., & Schwartz-Cornil, I. (1998). B-1-like cells exist in sheep. Characterization of their phenotype and behaviour. *Immunology*, 95(2), 178-184.
- Choi, Y. S., & Baumgarth, N. (2008). Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J Exp Med*, 205(13), 3053-3064.
- Chumley, M. J., Dal Porto, J. M., Kawaguchi, S., Cambier, J. C., Nemazee, D., & Hardy, R. R. (2000). A VH11V kappa 9 B cell antigen receptor drives generation of CD5+ B cells both in vivo and in vitro. *J Immunol*, 164(9), 4586-4593.
- Clarke, S. H., & Arnold, L. W. (1998). B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig)M+ B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J Exp Med*, 187(8), 1325-1334.
- Cong, Y. Z., Rabin, E., & Wortis, H. H. (1991). Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int Immunol*, 3(5), 467-476.
- Corbett, S. J., Tomlinson, I. M., Sonnhammer, E. L., Buck, D., & Winter, G. (1997). Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol*, 270(4), 587-597.
- Covens, K., Verbinen, B., Geukens, N., Meyts, I., Schuit, F., Van Lommel, L., Jacquemin, M., & Bossuyt, X. (2013). Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood*, 121(26), 5176-5183.
- Covens, K., Verbinen, B., Jacquemin, M., & Bossuyt, X. (2013). Response: Extended analysis of microarray data does not contradict preplasmablast phenotype of human CD20+CD27+CD43+ cells. *Blood*, 122(22), 3693-3694.
- De Silva, N. S., & Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*, 15(3), 137-148.
- Defrance, T., Taillardet, M., & Genestier, L. (2011). T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol*, 23(3), 330-336.
- Descatoire, M., Weill, J. C., Reynaud, C. A., & Weller, S. (2011). A human equivalent of mouse B-1 cells? *J Exp Med*, 208(13), 2563-2564.
- Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y., & Schmitz, J. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*, 194(12), 1823-1834.
- Fagarasan, S., Shinkura, R., Kamata, T., Nogaki, F., Ikuta, K., Tashiro, K., & Honjo, T. (2000). A lymphoplasia (aly)-type nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. *J Exp Med*, 191(9), 1477-1486.

- Förster, I., Gu, H., & Rajewsky, K. (1988). Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *EMBO J*, 7(12), 3693-3703.
- Förster, I., & Rajewsky, K. (1987). Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol*, 17(4), 521-528.
- Fox, L. M., Miksanek, J., May, N. A., Scharf, L., Lockridge, J. L., Veerapen, N., Besra, G. S., Adams, E. J., Hudson, A. W., & Gumperz, J. E. (2013). Expression of CD1c enhances human invariant NKT cell activation by alpha-GalCer. *Cancer Immun*, 13, 9.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., & Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 76(4), 1427-1435.
- Gavin, A. L., Ait-Azzouzene, D., Ware, C. F., & Nemazee, D. (2003). DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. *J Biol Chem*, 278(40), 38220-38228.
- Geiger, K. D., Klein, U., Bräuninger, A., Berger, S., Leder, K., Rajewsky, K., Hansmann, M. L., & Küppers, R. (2000). CD5-positive B cells in healthy elderly humans are a polyclonal B cell population. *Eur J Immunol*, 30(10), 2918-2923.
- Ghosh, E. E., Waters, J., Phillips, M., Yamamoto, R., Long, B. R., Yang, Y., Gerstein, R., Stoddart, C. A., Nakauchi, H., & Herzenberg, L. A. (2016). Fetal Hematopoietic Stem Cell Transplantation Fails to Fully Regenerate the B-Lymphocyte Compartment. *Stem Cell Reports*, 6(1), 137-149.
- Ghosh, E. E., Yamamoto, R., Hamanaka, S., Yang, Y., Herzenberg, L. A., Nakauchi, H., & Herzenberg, L. A. (2012). Distinct B-cell lineage commitment distinguishes adult bone marrow hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(14), 5394-5398.
- Gibbons, D., Fleming, P., Virasami, A., Michel, M. L., Sebire, N. J., Costeloe, K., Carr, R., Klein, N., & Hayday, A. (2014). Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nat Med*, 20(10), 1206-1210.
- Görgens, A., Radtke, S., Möllmann, M., Cross, M., Dürig, J., Horn, P. A., & Giebel, B. (2013). Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages. *Cell Rep*, 3(5), 1539-1552.
- Griffin, D. O., Holodick, N. E., & Rothstein, T. L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med*, 208(1), 67-80.
- Gross, J. A., Dillon, S. R., Mudri, S., Johnston, J., Littau, A., Roque, R., Rixon, M., Schou, O., Foley, K. P., Haugen, H., McMillen, S., Waggle, K., Schreckhise, R. W., Shoemaker, K., Vu, T., Moore, M., Grossman, A., & Clegg, C. H. (2001). TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity*, 15(2), 289-302.
- Gu, H., Förster, I., & Rajewsky, K. (1990). Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J*, 9(7), 2133-2140.
- Ha, S. A., Tsuji, M., Suzuki, K., Meek, B., Yasuda, N., Kaisho, T., & Fagarasan, S. (2006). Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J Exp Med*, 203(11), 2541-2550.

- Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A., & Tedder, T. F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, 23(1), 7-18.
- Haluska, F. G., Finver, S., Tsujimoto, Y., & Croce, C. M. (1986). The t(8; 14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. *Nature*, 324(6093), 158-161.
- Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (1994). CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol*, 55, 297-339.
- Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, 19, 595-621.
- Hardy, R. R., Hayakawa, K., Shimizu, M., Yamasaki, K., & Kishimoto, T. (1987). Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. *Science*, 236(4797), 81-83.
- Haury, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A., & Nobrega, A. (1997). The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol*, 27(6), 1557-1563.
- Hippen, K. L., Tze, L. E., & Behrens, T. W. (2000). CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med*, 191(5), 883-890.
- Holodick, N. E., Repetny, K., Zhong, X., & Rothstein, T. L. (2009). Adult BM generates CD5+ B1 cells containing abundant N-region additions. *Eur J Immunol*, 39(9), 2383-2394.
- Holodick, N. E., Tumang, J. R., & Rothstein, T. L. (2009). Continual signaling is responsible for constitutive ERK phosphorylation in B-1a cells. *Mol Immunol*, 46(15), 3029-3036.
- Huang, H. J., Jones, N. H., Strominger, J. L., & Herzenberg, L. A. (1987). Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(1), 204-208.
- Johnson, W. E., Li, C., & Rabinovic, A. (2007). Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*, 8(1), 118-127.
- Kantor, A. B., & Herzenberg, L. A. (1993). Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 11, 501-538.
- Kantor, A. B., Merrill, C. E., Herzenberg, L. A., & Hillson, J. L. (1997). An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol*, 158(3), 1175-1186.
- Kasmar, A., Van Rhijn, I., & Moody, D. B. (2009). The evolved functions of CD1 during infection. *Curr Opin Immunol*, 21(4), 397-403.
- Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2011). Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(23), 9530-9535.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., & Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*, 34(6), 961-972.
- Klein, U., Klein, G., Ehlin-Henriksson, B., Rajewsky, K., & Küppers, R. (1995). Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol Med*, 1(5), 495-505.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., Neri, A., Califano, A., & Dalla-Favera, R. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, 194(11), 1625-1638.

- Kocks, C., & Rajewsky, K. (1989). Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol*, 7, 537-559.
- Koskinen, R., Gobel, T. W., Tregaskes, C. A., Young, J. R., & Vainio, O. (1998). The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J Immunol*, 160(10), 4943-4950.
- Kroese, F. G., Ammerlaan, W. A., & Deenen, G. J. (1992). Location and function of B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci*, 651, 44-58.
- Küppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*, 20(40), 5580-5594.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L., & Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*, 12(13), 4955-4967.
- Lalor, P. A., Herzenberg, L. A., Adams, S., & Stall, A. M. (1989). Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur J Immunol*, 19(3), 507-513.
- Lefranc, M. P. (2003). IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>. *Leukemia*, 17(1), 260-266.
- Li, Y. S., Hayakawa, K., & Hardy, R. R. (1993). The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med*, 178(3), 951-960.
- Lydyard, P. M., Jewell, A. P., Jamin, C., & Youinou, P. Y. (1999). CD5 B cells and B-cell malignancies. *Curr Opin Hematol*, 6(1), 30-36.
- Mackay, F., Figgett, W. A., Saulep, D., Lepage, M., & Hibbs, M. L. (2010). B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev*, 237(1), 205-225.
- Malynn, B. A., Yancopoulos, G. D., Barth, J. E., Bona, C. A., & Alt, F. W. (1990). Biased expression of JH-proximal VH genes occurs in the newly generated repertoire of neonatal and adult mice. *J Exp Med*, 171(3), 843-859.
- Martin, F., & Kearney, J. F. (2000). B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev*, 175, 70-79.
- Masmoudi, H., Mota-Santos, T., Huetz, F., Coutinho, A., & Cazenave, P. A. (1990). All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15+ antibodies) are produced by peritoneal CD5+ B lymphocytes. *Int Immunol*, 2(6), 515-520.
- Morris, D. L., & Rothstein, T. L. (1993). Abnormal transcription factor induction through the surface immunoglobulin M receptor of B-1 lymphocytes. *J Exp Med*, 177(3), 857-861.
- Murphy, K. T. W., M. (2008). Janeway's Immunobiology Seventh Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC and informa business, New York, USA.
- Nakamura, M., Burastero, S. E., Notkins, A. L., & Casal, P. (1988). Human monoclonal rheumatoid factor-like antibodies from CD5 (Leu-1)+ B cells are polyreactive. *J Immunol*, 140(12), 4180-4186.
- Nisitani, S., Murakami, M., Akamizu, T., Okino, T., Ohmori, K., Mori, T., Imamura, M., & Honjo, T. (1997). Preferential localization of human CD5+ B cells in the peritoneal cavity. *Scand J Immunol*, 46(6), 541-545.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273(5272), 242-245.
- Pabst, O., Ohl, L., Wendland, M., Wurbel, M. A., Kremmer, E., Malissen, B., & Forster, R. (2004). Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J Exp Med*, 199(3), 411-416.

- Padilla, O., Calvo, J., Vila, J. M., Arman, M., Gimferrer, I., Places, L., Arias, M. T., Pujana, M. A., Vives, J., & Lozano, F. (2000). Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics*, 51(12), 993-1001.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., & Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11816-11821.
- Pennell, C. A., Mercolino, T. J., Grdina, T. A., Arnold, L. W., Haughton, G., & Clarke, S. H. (1989). Biased immunoglobulin variable region gene expression by Ly-1 B cells due to clonal selection. *Eur J Immunol*, 19(7), 1289-1295.
- Perez-Andres, M., Grosserichter-Wagener, C., Teodosio, C., van Dongen, J. J., Orfao, A., & van Zelm, M. C. (2011). The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J Exp Med*, 208(13), 2565-2566.
- Pospisil, R., Fitts, M. G., & Mage, R. G. (1996). CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med*, 184(4), 1279-1284.
- Raaphorst, F. M., van Bergen, J., van den Bergh, R. L., van der Keur, M., de Krijger, R., Bruining, J., van Tol, M. J., Vossen, J. M., & van den Elsen, P. J. (1994). Usage of TCRAV and TCRBV gene families in human fetal and adult TCR rearrangements. *Immunogenetics*, 39(5), 343-350.
- Raman, C., & Knight, K. L. (1992). CD5+ B cells predominate in peripheral tissues of rabbit. *J Immunol*, 149(12), 3858-3864.
- Rolink, A. G., Tschopp, J., Schneider, P., & Melchers, F. (2002). BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells. *Eur J Immunol*, 32(7), 2004-2010.
- Seifert, M., Sellmann, L., Bloehdorn, J., Wein, F., Stilgenbauer, S., Dürig, J., & Küppers, R. (2012). Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 209(12), 2183-2198.
- Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C., & Bondada, S. (1999). Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol*, 29(10), 3319-3328.
- Sidman, C. L., Shultz, L. D., Hardy, R. R., Hayakawa, K., & Herzenberg, L. A. (1986). Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science*, 232(4756), 1423-1425.
- Sims, G. P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C. H., Illei, G. G., & Lipsky, P. E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*, 105(11), 4390-4398.
- Sohn, H. W., Krueger, P. D., Davis, R. S., & Pierce, S. K. (2011). FcRL4 acts as an adaptive to innate molecular switch dampening BCR signaling and enhancing TLR signaling. *Blood*, 118(24), 6332-6341.
- Su, S. D., Ward, M. M., Apicella, M. A., & Ward, R. E. (1991). The primary B cell response to the O/core region of bacterial lipopolysaccharide is restricted to the Ly-1 lineage. *J Immunol*, 146(1), 327-331.
- Tangye, S. G. (2013). To B1 or not to B1: that really is still the question! *Blood*, 121(26), 5109-5110.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228(4706), 1440-1443.
- Van de Velde, H., von Hoegen, I., Luo, W., Parnes, J. R., & Thielemans, K. (1991). The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature*, 351(6328), 662-665.

- Vermeer, L. A., de Boer, N. K., Bucci, C., Bos, N. A., Kroese, F. G., & Alberti, S. (1994). MRC OX19 recognizes the rat CD5 surface glycoprotein, but does not provide evidence for a population of CD5bright B cells. *Eur J Immunol*, 24(3), 585-592.
- Werner-Favre, C., Vischer, T. L., Wohlwend, D., & Zubler, R. H. (1989). Cell surface antigen CD5 is a marker for activated human B cells. *Eur J Immunol*, 19(7), 1209-1213.
- Yang, T. J., Baldwin, C. L., Hanby-Florida, M., Mather, J. F., & Rabinovsky, E. D. (1995). Monoclonal antibody BLT-1, specific for the bovine homologue of CD5, reacts with the majority of mature T cells, a subpopulation of B cells and stimulates T cell proliferation. *Dev Comp Immunol*, 19(4), 337-346.
- Youinou, P., Jamin, C., & Lydyard, P. M. (1999). CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol Today*, 20(7), 312-316.
- Zeng, R., Spolski, R., Casas, E., Zhu, W., Levy, D. E., & Leonard, W. J. (2007). The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood*, 109(10), 4135-4142.
- Zhang, C., Xin, H., Zhang, W., Yazaki, P. J., Zhang, Z., Le, K., Li, W., Lee, H., Kwak, L., Forman, S., Jove, R., & Yu, H. (2016). CD5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer. *Immunity*, 44(4), 913-923.
- Zhong, X., Gao, W., Degauque, N., Bai, C., Lu, Y., Kenny, J., Oukka, M., Strom, T. B., & Rothstein, T. L. (2007). Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol*, 37(9), 2400-2404.



## 8. Anhang

### 8.1. Publikationen

#### 8.1.1. Originalpublikationen

Seifert, M., Przekopowicz, M., Taudien, S., Lollies, A., Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B. B., & Küppers, R. (2015). Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(6), E546-555.

Budeus, B., Schweigle de Reynoso, S., Przekopowicz, M., Hoffmann, D., Seifert, M., & Küppers, R. (2015). Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(38), E5281-5289.

Johansson, P., Bergmann, A., Rahmann, S., Wohlers, I., Scholtysik, R., Przekopowicz, M., Seifert, M., Tschurtschenthaler, G., Webersinke, G., Jager, U., Siebert, R., Klein-Hitpass, L., Dührsen, U., Dürig, J., & Küppers, R. (2016). Recurrent alterations of TNFAIP3 (A20) in T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*, 138(1), 121-124.

Oakes, C. C., Seifert, M., Assenov, Y., Gu, L., Przekopowicz, M., Ruppert, A. S., Wang, Q., Imbusch, C. D., Serva, A., Koser, S. D., Brocks, D., Lipka, D. B., Bogatyrova, O., Weichenhan, D., Brors, B., Rassenti, L., Kipps, T. J., Mertens, D., Zapatka, M., Lichter, P., Dohner, H., Küppers, R., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Byrd, J. C., & Plass, C. (2016). DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 48(3), 253-264.

#### 8.1.2. Leserbrief

Przekopowicz, M., Küppers, R., & Weniger, M. A. (2015). A large fraction of human tonsillar B cells expressing CD27 are germinal center B cells. *Immunol Cell Biol*, 93(5), 429-430. doi:10.1038/icb.2015.6

## 8.2. Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Ralf Küppers, dafür, dass er mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation gegeben hat und mich jeder Zeit mit Rat und Hilfestellungen unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich besonders bei Dr. Marc Seifert für sein Vertrauen, mir dieses Projekt zu überlassen, die enge und gute Zusammenarbeit sowie die kontinuierliche Unterstützung.

Der gesamten Arbeitsgruppe der AGII möchte ich für eine entspannte Arbeitsatmosphäre und nette Zusammenarbeit danken. Besonderer Dank geht an Sarah Taudien und Julia Jesdinsky-Elsenbruch für die technische Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit, Klaus Lennartz für die Hilfe bei Sortierarbeiten und Lukas Steinhoff, Eileen Meyer und Carola Barth für ihre Unterstützung während ihrer Abschlussarbeiten.

Bei Bettina Budeus möchte ich mich für bioinformatische Hilfe bedanken, Michael Möllmann für Mausearbeiten sowie Andre Görgens für die Bereitstellung und Aufarbeitung von HSC-Proben.

Zuletzt danke ich Tim Brauser, meinem Partner und Freund, für seine kontinuierliche Unterstützung, Ermutigungen und Rückhalt während der gesamten Zeit sowie meiner gesamten Familie, die immer für mich da war und ist.

Einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationsgruppen erzielt. Hierauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an den entsprechenden Stellen hingewiesen.

### **8.3. Tabellarischer Lebenslauf**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten**

## 8.4. Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Humane CD5<sup>+</sup> B-Zellen entsprechen murine B-1a-Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Martina Przekopowicz befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ralf Küppers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Martina Przekopowicz

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Martina Przekopowicz

## 8.5. Anhang Tabellen

Tabelle S1: Übersicht der Zellfraktionen von humanen hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen zur Humanisierung von NSG-Mäusen

Maus ID	Humane Quelle (ID)	Population/Subpopulation	Anzahl transferierter Zellen
1A1	Apherese A	CD34+ Bulk	$5,5 \times 10^4$
1A2	Apherese A	CD34+ Bulk	$5,5 \times 10^4$
1A3	Apherese A	CD34+ Bulk	$5,5 \times 10^4$
1B1	Apherese B	CD34+ Bulk	$6 \times 10^4$
1B2	Apherese B	CD34+ Bulk	$6 \times 10^4$
1B3	Apherese B	CD34+ Bulk	$6 \times 10^4$
2A1	adultes BM A	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
2A2	adultes BM A	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
2A3	adultes BM A	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
2B1	adultes BM B	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
2B2	adultes BM B	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
2B3	adultes BM B	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
3A1	UCB A	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
3A2	UCB A	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
3A3	UCB A	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
3B1	UCB B	CD34+ Bulk	$1,5 \times 10^5$
3B2	UCB B	CD34+ Bulk	$1,5 \times 10^5$
3B3	UCB B	CD34+ Bulk	$1,5 \times 10^5$
Mouse 01	BM48	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 02	BM48	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 03	UCB1104	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 04	UCB1104	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 05	UCB1106	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 06	UCB1106	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 07	UCB1106	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 08	UCB1106	MPPs	$1 \times 10^5$
Mouse 09	UCB1106	LMPPs	$1 \times 10^5$
Mouse 10	UCB1106	EMPs	$1 \times 10^5$
Mouse 11	UCB1106	RU	$1 \times 10^5$
Mouse 12	UCB1116	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 13	UCB1116	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 14	UCB1116	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 15	UCB1117	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 16	UCB1117	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 17	UCB1117	CD34+ Bulk	$1 \times 10^5$
Mouse 18	UCB1119	MPPs (fraction 1)	$3,5 \times 10^4$
Mouse 19	UCB1119	MPPs (fraction 1)	$3,5 \times 10^4$
Mouse 20	UCB1119	LMPPs (fraction 2)	$2,5 \times 10^4$
Mouse 21	UCB1119	LMPPs (fraction 2)	$2,5 \times 10^4$
Mouse 22	UCB1119	EMPs (fraction 3)	$1,5 \times 10^4$
Mouse 23	UCB1119	EMPs (fraction 3)	$1,5 \times 10^4$
Mouse 24	BM49	CD34+ Bulk	$5 \times 10^5$
Mouse 25	BM49	CD34+ Bulk	$5 \times 10^5$
Mouse 26	BM49	CD34+ Bulk	$5 \times 10^5$
Mouse 27	UCB1122	MPPs (fraction 1)	$1 \times 10^5$
Mouse 28	UCB1122	MPPs (fraction 1)	$1 \times 10^5$
Mouse 29	UCB1122	LMPPs (fraction 2)	$4 \times 10^4$
Mouse 30	UCB1122	LMPPs (fraction 2)	$4 \times 10^4$
Mouse 31	UCB1122	EMPs (fraction 3)	$2 \times 10^4$
Mouse 32	UCB1122	EMPs (fraction 3)	$2 \times 10^4$

\* BM = Knochenmark; UCB = Nabelschnurblut; MPP = Multipotente Vorläuferzellen; LMPP = Lymphoide multipotente Vorläuferzellen; EMP = Erythromyeloide Vorläuferzellen

**Tabelle S2: Übersicht der Anzahlen der Sequenzen aus den Sequenzierungen von IGHV-Genen verschiedener Populationen mehrerer Spender nach entsprechenden Filterschritten**

		Set#1 Anzahl der Sequenzen nach:		Set#2 Anzahl der Sequenzen nach:		Set#3 Anzahl der Sequenzen nach:	
Spender	B-Zelltyp	Sequenzierung	Kollabierung (UMI)	Sequenzierung	Kollabierung (UMI)	Sequenzierung	Kollabierung (UMI)      Angeglichene Zellzahl
<b>MS Spender 1</b>	5+A					469561	11743      6257
	5+B					586810	9482      5400
	5-A					934745	22341      5819
	5-B					787609	25531      5806
	5+27-A			700748	23143		
	5+27-B			720604	20545		
	5-27-A			883098	26252		
	5-27-B			825141	20131		
	5-27+A			815885	11514		
	5-27+B			751425	12015		
<b>GL Spender 2</b>	5+A					605244	10399      7879
	5+B					994686	6769      3972
	5-A					917648	29236      5849
	5-B					554796	15119      5875
	5+27-A			1017847	16891		
	5+27-B			660875	22384		
	5-27-A			816858	16181		
	5-27-B			677992	19040		
	5+27-	486329	83435				
	5-27-	430924	72880				

Spender	B-Zelltyp	Set#1 Anzahl der Sequenzen nach:		Set#2 Anzahl der Sequenzen nach:		Set#3 Anzahl der Sequenzen nach:		
		Sequenzierung	Kollabierung (UMI)	Sequenzierung	Kollabierung (UMI)	Sequenzierung	Kollabierung (UMI)	Angeglichene Zellzahl
FW Spender 3	5+A					702000	14221	8028
	5+B					976411	15854	7831
	5-A					385900	18538	7908
	5-B					856806	30202	7671
	5+27-A			840427	24124			
	5+27-B			1039170	15853			
	5-27-A			840949	23653			
	5-27-B			683093	21495			
	5+27-	1044566	143356					
	5-27-	1051842	170052					
	5-27+	966508	155175					
	5+27+	722794	89987					
CB	5+27-	766935	175953					
	5-27-	569087	97952					
	5-27+	1003626	154071					
	5+27+	1026914	175268					
AL	5+27-	311409	87085					
	5-27-	716800	121642					
	5-27+	591020	93047					
	5+27+	327499	43797					
ML	5+27-	919859	174832					
	5-27-	957824	208962					
	5-27+	843945	119138					
ME	5+27-	447791	67472					
	5-27-	428368	59246					
UCB_1	5+A					644369	29253	28246
	5+B					664036	56314	55082
	5-A					948429	56401	41363
	5-B					1280874	52993	41554
UCB_2	5+A					713268	19910	19404
	5+B					650538	52145	50956